

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Física I



**NUEVOS MATERIALES DE INTERÉS BIOMÉDICO A
PARTIR DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE
VINILPIRROLIDONA**

PRES **MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
ENTADA POR**

Myriam Gómez Tardajos

Bajo la dirección de los doctores

**Alberto Gallardo Ruiz
Helmut Reinecke**

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química-Física I



**CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)**

**Instituto de Ciencia y Tecnología de
Polímeros (ICTP)**

NUEVOS MATERIALES DE INTERES BIOMEDICO A PARTIR DE LA FUNCIONALIZACION DE VINILPIRROLIDONA

Myriam Gómez Tardajos

Directores:

Dr. Alberto Gallardo Ruiz

Dr. Helmut Reinecke

Madrid, 2013

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1-Funcionalización de PVP	1
2-Sistemas de dos componentes VP-metacrilato	4
3-Preparación de los copolímeros de VP estudiados	7
4-Hipótesis y objetivos de la tesis	7
5-Bibliografía	8
CAPÍTULO 1: Química de vinilpirrolidona	11
1- Introducción	13
2-Experimental	14
2.1. Reactivos	14
2.2. Síntesis de Monómeros	15
2.3. Síntesis de Entrecruzantes	21
2.4. Equipos	23
3-Resultados y discusión	23
4-Conclusiones	27
5-Bibliografía	28
CAPÍTULO 2: Relevancia de la homología del doble enlace polimerizable en la copolimerización radical de vinilpirrolidona	29
1- Introducción	31
1.1. Polimerización radical convencional	31
1.2. Copolimerización radical	33
2-Experimental	36
2.1. Reactivos	36
2.2. Reacciones de copolimerización a baja conversión	36
2.3. Cálculo de las relaciones de reactividad	37
2.4. Equipos	38
3-Resultados y discusión	38
3.1. Funcionalización de cadenas lineales derivadas de VP	38
3.1.1. Funcionalización de PVP con grupos sulfonato (como ejemplo) mediante copolimerización de VP con otros monómeros portadores de dicho grupo	38
3.1.2 Funcionalización de copolímeros heterogéneos VP-MMA	41
3.2. Redes. Homología del entrecruzante	41
3.2.1 Redes de VP	41
3.2.2 Redes de dos componentes VP-metacrilatos	44

Índice

4-Conclusiones.....	44
5-Bibliografía.....	45
CAPÍTULO 3: PVP sulfonada y biocompatible con propiedades antiangiogénicas.....	47
1- Introducción.....	49
2-Experimental.....	52
2.1. Reactivos.....	52
2.2. Polimerizaciones.....	52
2.3. Determinación estadística de diadas.....	54
2.4. Estudios de citotoxicidad in vitro.....	54
2.5. Análisis de bioactividad: antiangiogénesis.....	55
2.6. Equipos.....	55
3-Resultados y discusión.....	56
3.1. Síntesis y caracterización de Copolímeros lineales.....	56
3.2. Ensayos de citotoxicidad de los copolímeros lineales.....	60
3.3. Análisis de bioactividad de los copolímeros lineales: antiangiogénesis.....	62
3.4. Redes: Preparación, caracterización y citotoxicidad.....	64
4-Conclusiones.....	66
5-Bibliografía.....	67
CAPÍTULO 4: Influencia de PVP funcionalizada con aminas aromáticas en los estados de agregación de la porfirina TPPS.....	69
1- Introducción.....	71
2-Experimental.....	77
2.1. Reactivos.....	77
2.2. Copolimerizaciones.....	77
2.3. Evaluación del pK de la amina de V _N	78
2.4. Estudios de interacciones.....	78
2.5. Formación de agregados polímero-colorante.....	78
2.6. Equipos.....	78
3-Resultados y discusión.....	79
3.1. Síntesis de polímeros.....	79
3.2. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS.....	82
3.3. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de Quitosano.....	84
3.4. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de PVP.....	85
3.5. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de copolímeros poli(VP-co-V _N)	86

3.6. Formación de agregados polímero-colorante.....	90
3.7. Fortaleza de la interacción con los polímeros (VP-co-V _N)	91
4-Conclusiones.....	92
5-Bibliografía.....	94

CAPÍTULO 5: Funcionalización selectiva de sistemas dispersos de poli (MMA-co-VP) precursores de partículas.....

99

1- Introducción.....	101
2-Experimental.....	104
2.1. Reactivos.....	104
2.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄) mNPs.....	104
2.3. Copolimerización.....	105
2.4. Emulsiones líquido/líquido y esferas sólidas.....	105
2.5. Ensayo colorimétrico.....	105
2.6. Caracterización-Equipos.....	106
3-Resultados y discusión.....	106
3.1. Descripción teórica del sistema.....	106
3.2. Funcionalización selectiva de las fases: guiado de las Nanopartículas Magnéticas (mNPs) en las emulsiones líquido/líquido.....	108
3.3. Formación de partículas sólidas: Funcionalización selectiva de la superficie o el núcleo.....	111
3.4. Funcionalización de superficies.....	116
4-Conclusiones.....	120
5-Bibliografía.....	122

CAPÍTULO 6: Redes de dos componentes VP-metacrilatos alifáticos. Evaluación de las propiedades conductoras de las redes al incorporar V_s.....

127

1- Introducción.....	129
2-Experimental.....	132
2.1. Reactivos.....	132
2.2. Fotopolimerizaciones.....	132
2.3. Análisis de extraíbles (monómero residual y fracción sol)	132
2.4. Hinchamiento.....	133
2.5. Equipos.....	133
3-Resultados y discusión.....	134
3.1. Redes anfífilas de metacrilatos y vinilpirrolidona.....	134
3.1.1. Descripciones teóricas de las reacciones y de la formación de redes en condiciones 'ideales'	137
3.1.2. Caracterización de las redes reales: Extraíbles (monómero residual y fracción sol).....	142

Índice

3.1.3. Propiedades Dinamo Mecánicas, DMTA. Consideraciones comunes a los dos sistemas.	151
3.1.4. Características en hinchado.....	153
3.2. Funcionalización de las redes con grupos sulfonato: estudio de conductividad.....	153
3.2.1. Caracterización de las redes.....	156
3.2.2. Caracterización y Propiedades Dieléctricas de los Polielectrolitos.....	174
4-Conclusiones.....	175
5-Bibliografía.....	

APÉNDICES

	179
Apéndice 1.....	181
Apéndice 2.....	184
Apéndice 3.....	185
Apéndice 4.....	187

AGRADECIMIENTOS.....

189

Introducción

Poli-(N-vinilpirrolidona) (según la IUPAC Poli-(N-vinilpirrolidinona)) o Povidona, PVP (Figura 1), es un polímero sintetizado por primera vez en los años 30, soluble en agua, no iónico, no tóxico, químicamente estable y con alta inercia biológica que se emplea en muchas aplicaciones. Se usa por ejemplo en cosmética, artículos de higiene personal, pinturas, adhesivos, lentes de contacto y es uno de los materiales sintéticos con más historia en el campo de las aplicaciones biomédicas. Se usó en la segunda guerra mundial como expansor o dilatador de plasma sanguíneo¹, y fue el polímero elegido para preparar el primer conjugado inyectable polímero-fármaco². En este campo de la bioconjugación, es un soporte muy atractivo en cáncer por su alto tiempo de residencia en plasma y su reducida distribución tisular, comparado con otros polímeros sintéticos³⁻⁶. Adsorbido o anclado en superficies resiste la adsorción no específica de proteínas⁷⁻¹². Junto con el yodo se usa para la preparación de betadine®, ha sido un componente clásico de lentes de contacto y es usado en alimentación como aditivo, estabilizante (E1201), clarificante en bebidas, etc. (está aprobado para este uso por la Food and Drug Administration (FDA)). Tanto la PVP como su unidad estructural, N-vinilpirrolidona (VP), forman parte del grupo de componentes biocompatibles de primera elección en el diseño de biomateriales.

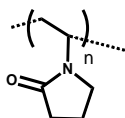


Figura 1: Estructura de la unidad repetitiva de PVP.

1-Funcionalización de PVP

Debido al potencial que presenta la PVP, en múltiples aplicaciones existe un gran interés en su funcionalización. Sin embargo, la inercia química de los anillos laterales de lactama restringe el uso de PVP en aquellas que requieran funcionalización o conjugación lateral de las unidades repetitivas. Los extremos de cadena sí pueden ser funcionalizados durante el proceso de polimerización de VP, por ejemplo usando agentes de transferencia funcionales o terminadores específicos en polimerización controlada o viva¹³⁻¹⁵. Sin embargo, la funcionalización lateral ofrece amplias posibilidades debido al mayor número de grupos funcionales que se pueden introducir y la aleatoriedad de los mismos.

Con el fin de obtener PVP funcionalizada en la cadena lateral se pueden distinguir tres estrategias: 1- funcionalización del homopolímero de PVP por reacciones de modificación química, 2- copolimerización de VP con diferentes tipos de monómeros portadores del grupo funcional y 3- funcionalización del monómero VP y posterior homo o copolimerización con VP. Estas dos últimas rutas comparadas con la primera de modificación del polímero preformado se pueden considerar rutas *bottom-up* de preparación de polímeros funcionalizados a partir de precursores adecuados.

En relación a la estrategia 1, otros grupos de investigación han intentado funcionalizar PVP por modificación del polímero (esquema de la Figura 2). PVP es un polímero que contiene grupos amidas cíclicas que se pueden abrir, por ejemplo, por hidrólisis¹⁶⁻¹⁷ con lo que se obtienen copolímeros multifuncionales de cadena lateral en los que, sin embargo, no se mantiene la integridad de los anillos. Se ha descrito también la bromación¹⁸ de la PVP a altas temperaturas, que conduce a un polímero con una modificación bastante poco específica, así como la epoxidación¹⁹ de PVP.

Introducción General

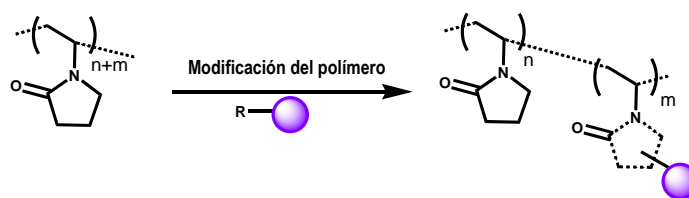


Figura 2: Ruta 1 de funcionalización de PVP. Funcionalización por modificación de PVP.

La desventaja general de la modificación de polímeros es la imposibilidad de purificar los productos obtenidos. De hecho, resulta imposible eliminar unidades que no hayan reaccionado o aquellas que hayan conducido a reacciones secundarias no deseadas ya que todos ellos están anclados covalentemente a las cadenas macromoleculares.

La funcionalización lateral de la PVP se ha realizado mayoritariamente siguiendo la ruta *bottom up* 2, mediante copolimerización radical de VP con otros monómeros portadores de la funcionalidad (esquema de la Figura 3). En este caso la funcionalización no la portan las unidades de VP sino comonómeros como anhídrido maléico (MA)²⁰⁻²⁴ y sus derivados, ácido acrílico (AA)²⁵, aminoalquilacrilamidas²⁶, aminoalquil e hidroxialquilolefinas²⁷ u otros.

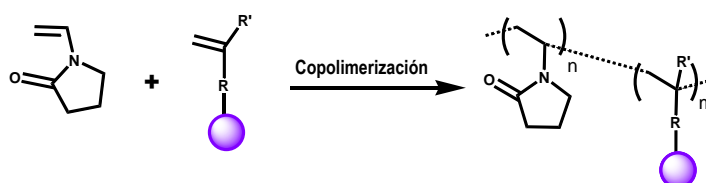


Figura 3: Ruta 2 de funcionalización de PVP. Ruta *bottom-up* de copolimerización de VP con monómeros 'heterólogos'.

Estas copolimerizaciones con otros componentes que no sean VP (que podemos denominar 'heterólogos' hacia VP) no deberían considerarse funcionalizaciones auténticas de PVP porque conducen a esqueletos macromoleculares que no solo contienen unidades de VP.

Además, este tipo de procesos de copolimerización tiene la desventaja asociada a las reactividades diferenciales de los comonómeros que en algunos casos pueden resultar muy relevantes²⁸ y pueden conducir a una heterogeneidad composicional extrema del polímero resultante. En realidad VP es un monómero peculiar en copolimerización radical ya que es un monómero 'poco activado' y en copolimerización por ejemplo con acrílicos (la familia comercial más numerosa y empleada en parte de este trabajo) cualquiera de los macrorradicales en crecimiento es mucho más reactivo hacia la unidad acrílica que hacia la VP. El resultado es que en un reactor discontinuo y a altas conversiones, el 'acumulado' de cadenas de copolímeros será muy heterogéneo y estará formado por cadenas ricas en la unidad más reactiva y cadenas ricas en VP, formadas al principio y al final de la reacción respectivamente.

Esta baja activación de la VP es la responsable de que su copolimerización radical con monómeros acrílicos 1,2 disustituidos no homopolimerizables como los derivados de maléico o fumárico, de lugar a copolímeros alternantes o con una alta tendencia a la alternancia. Debido a la mencionada baja activación de VP un

macrorradical acabado en VP es mucho más reactivo hacia el otro comonómero, y el nuevo macrorradical formado acabado en maleato solo puede reaccionar con VP debido al impedimento estérico de la sustitución 1,2. En consecuencia, se forman secuencias alternantes casi puras hasta que se consume uno de los dos monómeros. Este hecho ha sido usado ampliamente para preparar, dentro de esta estrategia 2, PVP funcionalizada²⁹⁻³¹ con una distribución alternante (ver Figura 4).

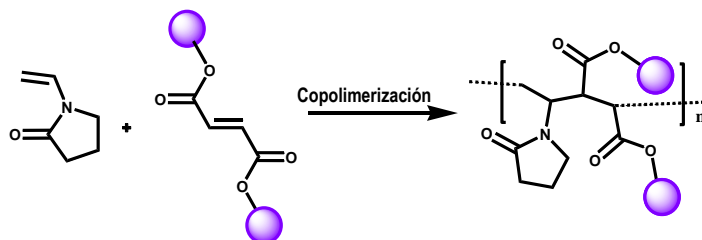


Figura 4: Ruta 2 de funcionalización de PVP. Copolimerización alternante entre VP y un fumarato disustituido.

PVP con grupos carboxilos puede ser fácilmente obtenida por esta vía por hidrólisis del anhídrido maléico o del éster. A pesar de la utilidad de los copolímeros alternantes hay que destacar que no es posible modular la carga de funcionalidad ya que al poder formarse solo secuencias alternantes solo hay una composición viable, la equimolecular. Además, esta macromolécula no puede describirse como PVP funcionalizada puesto que se pierde la integridad de la cadena; el polímero ya no es PVP sino otro copolímero.

Las limitaciones mencionadas asociadas al uso de comonómeros ‘heterólogos’ a la VP como los acrílicos (heterogeneidad composicional y pérdida del esqueleto de la PVP) hacen que la mejor alternativa para la preparación de derivados de PVP multifuncionales de cadena lateral sea la ruta *bottom-up* homóloga de modificación del monómero de la VP seguida por homo- o copolimerización con VP no modificada, es decir, la ruta 3 mencionada al principio (Figura 5).

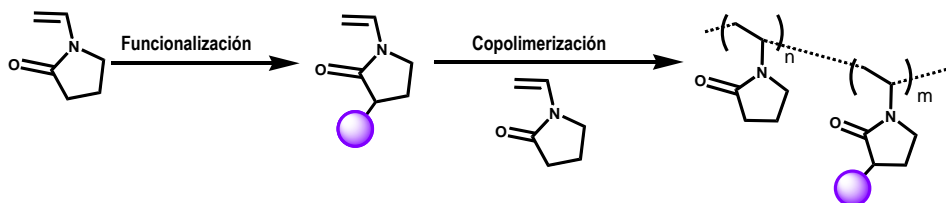


Figura 5. Ruta 3 de funcionalización de PVP. Ruta *bottom-up* homóloga de funcionalización de PVP mediante derivatización de VP y posterior copolimerización con VP pura.

Esta ruta proporciona un control versátil del número de grupos funcionales y de la composición y además permite una distribución al azar de grupos funcionales manteniendo la integridad de la cadena. De este modo se pueden obtener cadenas principales de PVP puro manteniendo además la integridad de los anillos de la pirrolidona. Además, las reactividades de la VP original y VP modificada serían muy similares, dada la homología del doble enlace, y se podrían evitar así las heterogeneidades en copolimerización provocadas por reactividades diferenciales mencionadas anteriormente.

Esta argumentación en términos de homogeneidad puede trasladarse al caso de formación de redes de VP.

Introducción General

La heterogeneidad composicional que originaría el uso de entrecruzantes heterólogos como el acrílico comercial etilenglicol dimetacrilato (EGDMA, a lo largo de esta tesis MM) se traduciría en una heterogeneidad en densidad de entrecruzamiento al incorporarse mayoritariamente el entrecruzante a las primeras cadenas en formación dejando las últimas cadenas en formación sin puntos de entrecruzamiento. De nuevo, para la obtención de redes de VP con una óptima homología en densidad de entrecruzamiento se requieren entrecruzantes homólogos derivados de VP (Figura 6).

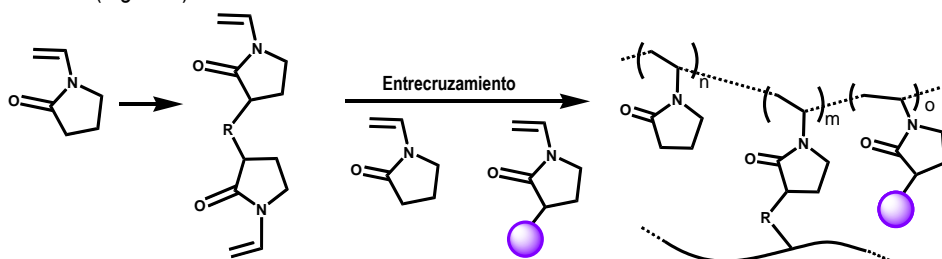


Figura 6: Síntesis de redes de PVP con entrecruzante homólogo

Por todo ello, la primera parte de esta tesis está dedicada en primer lugar a la puesta a punto de métodos sintéticos que permitan obtener VPs funcionalizadas así como entrecruzantes homólogos VP-R-VP (capítulo 1). Estos compuestos en un segundo paso van a permitir obtener de forma sencilla, mediante simple copolimerización radical convencional (incluso en agua), cadenas lineales o redes de PVP funcionalizadas (capítulo 2) que se ajustan a la ruta 3 homóloga descrita anteriormente. De esta forma se han podido preparar y evaluar PVPs portadoras de grupos sulfonato y amina aromática (capítulos 3 y 4). Estos sistemas homólogos ofrecen un sencillo ajuste de carga y pueden tener interés en tratamientos frontera como la antiangiogénesis o la terapia fotodinámica.

2-Sistemas de dos componentes VP-metacrilatos

Como se ha mencionado antes, VP en copolimerización radical es un monómero 'poco activado'. Algunos autores lo incluyen incluso en el grupo de monómeros 'no homopolimerizables'³². De acuerdo al esquema empírico Q,e de Alfrey y Price³³ (donde Q y e son parámetros relacionados con la estabilización por resonancia y la polaridad respectivamente), muy utilizado históricamente para predecir y discutir copolimerizaciones binarias, el bajo valor de Q de VP³⁴ hace que en la mencionada copolimerización con acrílicos (o con metacrilatos, los comonómeros usados en esta tesis) cualquiera de los macrorradicales en crecimiento sea mucho más reactivo hacia la unidad metacrílica (que tiene un alto valor de Q y es por lo tanto capaz de estabilizarse por resonancia) que hacia la VP. El resultado es, como se ha mencionado antes, una alta heterogeneidad composicional en reactores discontinuos, heterogeneidad que es un claro inconveniente si el objetivo es preparar cadenas bien definidas de PVP funcionalizada.

Una prueba clara de esta heterogeneidad en la copolimerización radical entre VP y metacrilatos se presenta en la Figura 7³⁵ donde el electroferograma inferior muestra el análisis por MEKC (cromatografía electrocinética micelar) de un acumulado a alta conversión de un copolímero prácticamente equimolar VP-metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA).

Básicamente, MECK detectó dos especies bien diferenciadas con diferente hidrofobicidad, que se asignaron a cadenas ricas en HEMA y en VP respectivamente (picos 1 y 2)³⁵. Un análisis de la reacción a baja conversión (5 horas de reacción, electroferograma superior) mostró un solo pico, el más hidrofóbico, asignado a cadenas ricas en el monómero HEMA más reactivo, y que son las primeras que se forman.

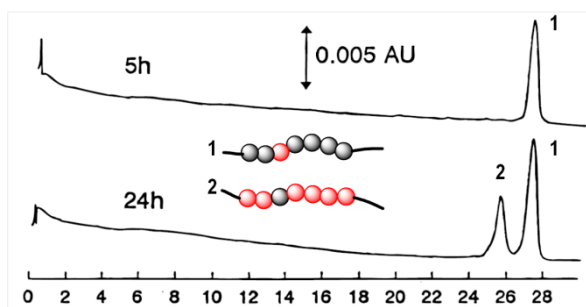


Figura 7: Electroferogramas de dos reacciones de copolimerización VP-HEMA aproximadamente equimolares detenidas tras 5 y 24 horas de reacción. Las unidades de VP y metacrílicas están representadas por esferas rojas y negras respectivamente (AU: unidades arbitrarias).

Siendo la heterogeneidad composicional asociada al consumo preferente de los metacrilatos necesariamente continua, la pregunta que puede surgir es ¿por qué se observan en MECK dos picos separados en vez de un solo pico ancho? La Figura 8, donde se representa la variación composicional de la copolimerización de VP-HEMA que dio lugar a los picos de la Figura 7, puede responder a esta cuestión. Esta Figura se ha tomado de la referencia 35. Se observa que aunque efectivamente la variación composicional es un continuo, la gráfica es una sinusoidal que tiende a la forma de una función escalera, es decir, que sí existe una tendencia intrínseca a la formación de dos tipos principales de especies, aunque en cualquier caso no son especies discretas sino que sigue existiendo un continuo en la variación composicional.

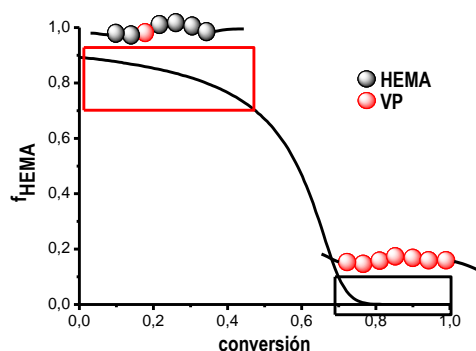


Figura 8. Fracción molar instantánea de HEMA en el copolímero en función de la conversión para la copolimerización equimolar de VP y HEMA.

Por tanto en la copolimerización de VP con metacrilatos (en una sola reacción) se forman dos tipos principales de especies bien diferenciadas. Este hecho puede ser visto como una oportunidad en química de

Introducción General

polímeros, de cara a preparar estructuras ‘especiales’ de dos componentes mediante copolimerización de VP con diferentes metacrilatos. Por ello, en la segunda parte de la tesis (capítulos 5 y 6) se han intentado preparar sistemas inéditos de dos componentes VP-metacrilatos utilizando para ello la química sobre VP desarrollada en la primera parte del trabajo.

En este sentido, se ha descrito recientemente por el grupo de trabajo en el que se ha llevado a cabo este estudio que la copolimerización de VP y metacrilato de metilo (MMA) en metanol da lugar a un sistema de dos fases, una dispersa poblada por las cadenas ricas en MMA y otra fase continua rica en VP ³⁶. Este hecho está relacionado con el fenómeno de UCST (upper critical solution temperature) que presentan las cadenas ricas en polimetacrilato de metilo (PMMA) en alcoholes. A temperatura ambiente dichas cadenas están por debajo de la UCST y forman una fase rica en las mismas. La adición de agua permite obtener microesferas sólidas ricas en MMA estabilizadas por cadenas ricas en VP en un proceso que puede considerarse autoestabilizante. En la Figura 9 se muestra este proceso de forma esquemática.

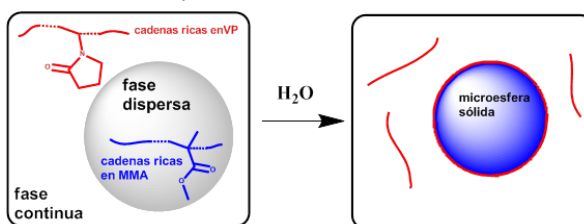


Figura 9: Esquema representativo del proceso de separación de fases y formación de partículas sólidas tras la copolimerización de VP y MMA y la formación de las dos especies descritas en el texto.

A partir de este trabajo previo, en el capítulo 5 se ha analizado la posibilidad de la funcionalización selectiva de las dos especies y de las dos fases utilizando comonómeros homólogos, es decir, metacrilatos comerciales ó algunos de los derivados de VP descritos en la primera parte de la tesis. El objetivo final es obtener micro o nanoesferas sólidas funcionalizadas selectivamente en la superficie o en el núcleo.

En el último capítulo (6) se abordan los conceptos anteriormente mencionados de homología de funcionalidad de los dobles enlaces polimerizables, y de la oportunidad de la heterogeneidad composicional en la copolimerización de VP y metacrilatos (Figura 10).

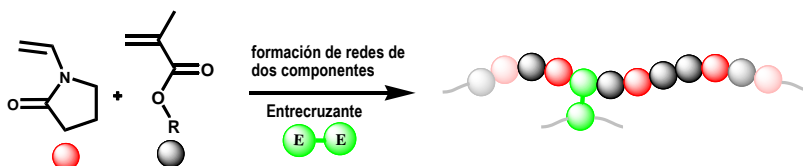


Figura 10: Formación de redes de dos componentes en función de la naturaleza del entrecruzante

De acuerdo a estudios previos llevados a cabo en el grupo³⁷⁻³⁸, la homología del entrecruzante define la topología de la red en sistemas de dos componentes con alta reactividad diferencial, como los monómeros objeto de este capítulo. Para llevar a cabo el estudio del entrecruzamiento con estos monómeros se ha utilizado la química de VP en la preparación de nuevos entrecruzantes simétricos VP-R-VP homólogos a VP (y mencionados anteriormente) o asimétricos bihomólogos a VP y al grupo metacrilato (VP-R'-metacrilato). Básicamente, y en el

contexto de alta heterogeneidad y formación de dos especies principales, una funcionalidad homóloga a VP entrecruzarán preferentemente cadenas ricas en VP mientras que una funcionalidad homóloga a metacrilatos se incorporará preferentemente a cadenas ricas en metacrilato. Una descripción más detallada se encuentra en el capítulo 2 y especialmente en dicho capítulo 6. Además, la incorporación de la VP con grupos sulfonato obtenida en el capítulo 1, permite la evaluación de la conductividad iónica de estas redes hinchadas en agua.

3-Preparación de los copolímeros de VP estudiados

En este trabajo de tesis, los diferentes sistemas derivados de VP se han preparado mediante copolimerización radical convencional en solución usando iniciación térmica para preparar las cadenas lineales, o mediante fotopolimerización en masa para obtener las redes. Ambos son procesos muy sencillos que se llevan a cabo en horas o minutos respectivamente, y que solo necesitan desplazar el oxígeno disuelto mediante una corriente de nitrógeno. Además, como VP y muchos de sus derivados son solubles en medios acuosos, algunos de los procesos de polimerización pueden llevarse a cabo en agua, lo cual es atractivo desde un punto de vista medioambiental (química verde). En el capítulo 2 se hace una descripción del proceso de polimerización radical. En definitiva, los procesos son muy sencillos y poco exigentes. En este trabajo de tesis el esfuerzo sintético se ha centrado en la modificación de VP.

4-Hipótesis y objetivos de la tesis

La tesis parte de esta hipótesis: la copolimerización radical de VP con otros componentes portadores de grupos polimerizables homólogos (comonómeros funcionalizados o entrecruzantes derivados de VP) permite obtener materiales con estructuras inéditas como: auténtica PVP funcionalizada, sistemas dispersos derivados de VP y MMA con funcionalización selectiva de los componentes ó redes anfífilas con topologías que tienden hacia redes interpenetradas (IPNs) o co-redes.

Los objetivos concretos del trabajo son:

- 1- Puesta a punto de un método versátil de funcionalización de VP. Preparación de diferentes VPs funcionalizadas así como de entrecruzantes simétricos y asimétricos derivados de VP.
- 2- Preparación y caracterización de diferentes PVPs funcionalizadas mediante la copolimerización con VP de los derivados homólogos sintetizados.
- 3- Selección y evaluación - en colaboración con grupos de investigación complementarios - de PVPs funcionalizadas con potencial utilidad en diferentes aplicaciones biomédicas.
- 4- Estudio de la influencia de la adición de comonómeros homólogos (metacrilatos o derivados de VP) en el proceso de separación de fases de la copolimerización de VP y MMA en metanol, así como en el correspondiente proceso de formación de partículas sólidas dispersables en agua.
- 5- Estudio de la influencia de la homología del entrecruzante en las propiedades de redes anfífilas VP-metacrilatos.
- 6- Preparación de redes anfífilas portadoras de grupos sulfonato. Estudio de la conductividad iónica de estas redes hinchadas en agua en colaboración con otro grupo de investigación complementario.

Bibliografía

- 1 Ravin, H. A., Seligman, A. M. & Fine, J. Polyvinyl pyrrolidone as a plasma expander. *New England Journal of Medicine* **247**, 921-929 (1952).
- 2 Jatzkewitz, H. Peptamin (glycyl-L-leucyl-mescaline) bound to blood plasma expander (polyvinylpyrrolidone) as a new depot form of a biologically active primary amine mescaline. *Naturforsch Z* **10b**, 27-31 (1955).
- 3 Kamada, H. *et al.* Antitumor activity of tumor necrosis factor- α conjugated with polyvinylpyrrolidone on solid tumors in mice. *Cancer research* **60**, 6416 (2000).
- 4 Kaneda, Y. *et al.* The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials* **25**, 3259-3266 (2004).
- 5 Satchi-Fainaro, R., Duncan, R. & Barnes, C. Polymer therapeutics for cancer: current status and future challenges. *Polymer Therapeutics II*, 1-65 (2006).
- 6 Tsunoda, S. *et al.* Molecular design of polyvinylpyrrolidone-conjugated interleukin-6 for enhancement of in vivo thrombopoietic activity in mice. *Journal of controlled release* **68**, 335-341 (2000).
- 7 Robinson, S. & Williams, P. A. Inhibition of protein adsorption onto silica by polyvinylpyrrolidone. *Langmuir* **18**, 8743-8748 (2002).
- 8 Hayama, M., Yamamoto, K., Kohori, F. & Sakai, K. How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility? *Journal of membrane science* **234**, 41-49 (2004).
- 9 Wu, Z. *et al.* Protein adsorption on poly (N-vinylpyrrolidone)-modified silicon surfaces prepared by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Langmuir* **25**, 2900-2906 (2009).
- 10 Hayama, M. *et al.* Nanoscopic behavior of polyvinylpyrrolidone particles on polysulfone/polyvinylpyrrolidone film. *Biomaterials* **25**, 1019-1028 (2004).
- 11 Ko, M. K., Pellegrino, J. J., Nassimbene, R. & Marko, P. Characterization of the adsorption-fouling layer using globular proteins on ultrafiltration membranes. *Journal of membrane science* **76**, 101-120 (1993).
- 12 Matsuda, M. *et al.* Nanotechnological evaluation of protein adsorption on dialysis membrane surface hydrophilized with polyvinylpyrrolidone. *Journal of membrane science* **310**, 219-228 (2008).
- 13 Zelikin, A. N., Georgina, K., Postma, A. & Caruso, F. Poly (vinylpyrrolidone) for bioconjugation and surface ligand immobilization. *Biomacromolecules* **8**, 2950-2953 (2007).
- 14 Pound, G., McKenzie, J. M., Lange, R. F. M. & Klumperman, B. Polymer-protein conjugates from ω -aldehyde endfunctional poly (N-vinylpyrrolidone) synthesised via xanthate-mediated living radical polymerisation. *Chemical Communications*, 3193-3195 (2008).
- 15 Baldoli, C. *et al.* Functionalization and molecular dynamics study of carboxy-terminated poly (1-vinylpyrrolidin-2-one): A potential soluble carrier of biomolecules. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 1683-1698 (2008).

- 16 Von Specht, B. U. & Brendel, W. Preparation and properties of trypsin and chymotrypsin coupled covalently to poly (N-vinylpyrrolidone). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **484**, 109-114 (1977).
- 17 D'Souza, A. J. M., Schowen, R. L. & Topp, E. M. Polyvinylpyrrolidone–drug conjugate: synthesis and release mechanism. *Journal of controlled release* **94**, 91-100 (2004).
- 18 Albrecht, W. *et al.* Modification of poly (ether imide) membranes with brominated polyvinylpyrrolidone. *Journal of membrane science* **291**, 10-18 (2007).
- 19 Devarajan, R., Arunachalam, V., Kumaraswamy, M., Tajuddin, I. & Joghee, T. Darzen's glycidic ester condensation reaction on poly (N-vinyl pyrrolidone). *Journal of Applied Polymer Science* **44**, 1473-1475 (1992).
- 20 Samoilova, N. A. *et al.* Polyelectrolyte thromboresistant affinity coatings for modification of devices contacting blood. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **82**, 589-598 (2007).
- 21 Qian, G., Ma, J., Zhou, J. & He, B. Chemical modification of *E. coli* L-asparaginase with poly (N-vinylpyrrolidone-co-maleic anhydride). *Reactive and functional polymers* **32**, 117-121 (1997).
- 22 Móra, M., Pató, J. & Tüdös, F. Polymeric prodrugs, 6. Synthesis and examination of 6-purinethiol bound to poly (1-vinyl-2-pyrrolidone-co-maleic acid). *Die Makromolekulare Chemie* **190**, 1967-1974 (1989).
- 23 Kalnay, A. *et al.* Influence on antiproliferative activity of structural modification and conjugation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues. *Cell Proliferation* **33**, 275-285 (2000).
- 24 Babakhin, A. A. *et al.* Immunological properties of allergen chemically modified with synthetic copolymer of N-vinylpyrrolidone and maleic anhydride. *OceanSide Publications, Inc* **16**, 261-268 (1995).
- 25 Liu, F., Song, S. C., Mix, D., Baudyš, M. & Kim, S. W. Glucose-induced release of glycosylpoly (ethylene glycol) insulin bound to a soluble conjugate of concanavalin A. *Bioconjugate chemistry* **8**, 664-672 (1997).
- 26 Login, R. B., Shih, J. S. & Chuang, J. C. Crosslinkable, functional polymers of vinylpyrrolidone and aminoalkyl acrylamides. *Google Patents* (1993).
- 27 Merijan, A. Process for the preparation of functional polymers from n-vinyl pyrrolidone *Google Patents* (1971).
- 28 Sánchez-Chaves, M., Martínez, G., López Madruga, E. & Fernández-Monreal, C. Synthesis of statistical glycidyl methacrylate-n-vinyl pyrrolidone copolymers and their reaction with naproxen. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **40**, 1192-1199 (2002).
- 29 Yamamoto, Y. *et al.* Poly (vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier. *Journal of controlled release* **95**, 229-237 (2004).
- 30 Abe, Y. *et al.* Promotion of optimized protein therapy by bioconjugation as a polymeric DDS. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)* **6**, 251-258 (2006).
- 31 Kim, S., Wan Kim, S. & Bae, Y. H. Synthesis, bioactivity and specificity of glucagon-like peptide-1 (7–37)/polymer conjugate to isolated rat islets. *Biomaterials* **26**, 3597-3606 (2005).
- 32 Braun, D. & Hu, F. Polymers from non-homopolymerizable monomers by free radical processes. *Progress in Polymer Science* **31**, 239-276 (2006).

Introducción General

- 33 Alfrey, T. & Price, C. C. Relative reactivities in vinyl copolymerization. *Journal of Polymer Science* **2**, 101-106 (1947).
- 34 Brandrup, J. I., E.H. Polymer Handbook 4th ed. Wiley (2003).
- 35 Gallardo, A., Lemus, A. R., San Román, J., Cifuentes, A. & Díez-Masa, J. C. Micellar electrokinetic chromatography applied to copolymer systems with heterogeneous distribution. *Macromolecules* **32**, 610-617 (1999).
- 36 Aranaz, I., Reinecke, H., Elvira, C. & Gallardo, A. Compositionally-tunable surface nanostructuration of microspheres obtained from a self-stabilizing copolymerization of methylmethacrylate and vinylpyrrolidone. *Polymer* **52**, 2991-2997 (2011).
- 37 Demirgöz, D., Navarro, R., Pérez, M., Reinecke, H. & Gallardo, A. Asymmetric bihomologous crosslinkers for bicomponent gels—The way to strongly increased elastic moduli. *Journal of Applied Polymer Science* **115**, 896-900 (2009).
- 38 Reinecke, H. & Gallardo, A. Symmetric Versus Asymmetric “Homologous” Vinylic Cross-Linkers in Two-Components Networks: Formation of Pseudo-Conetworks or Pseudo-IPNs. *Macromolecular Theory and Simulations* **18**, 25-29 (2009).

Capítulo 1

Química de Vinilpirrolidona

1-Introducción:

La modificación del monómero 1-vinil-2-pirrolidona (VP) seguida por homo- o copolimerización con VP no modificada parece ser, como se ha descrito en la introducción de la tesis, la mejor alternativa para la preparación de derivados de PVP multifuncionales de cadena lateral. Esta ruta de síntesis de PVP funcionalizada permite un control versátil del número de grupos funcionales y de la composición y que además tenga una distribución al azar de las funcionalidades. De este modo se pueden obtener cadenas principales de PVP puro manteniendo además la integridad de los anillos de la pirrolidona. La síntesis de PVP funcionalizada por esta vía requiere el esfuerzo sintético de obtener el monómero VP funcionalizado.

Como amida cíclica, la VP contiene un enlace carbono-hidrógeno fuertemente polarizado en posición α del grupo carbonilo (posición 3 en el anillo). Con bases fuertes se puede abstraer este hidrógeno, formando el anión del enolato de la carboxiamida. Este compuesto intermedio se puede emplear para atacar compuestos electrófilos dado su carácter nucleófilo. La modificación de la VP haciendo reaccionar el enolato de la carboxiamida permite preservar el anillo de la lactama y el doble enlace polimerizable.

Esta funcionalización en posición 3 se llevó a cabo por primera vez por White et al¹ por ataque nucleófilo a alquilhaluros para conectar cadenas hidrocarbonadas puras a la VP y para sintetizar entrecruzantes portadores de dos unidades de VP unidas por una cadena hidrocarbonada. Sin embargo, la inestabilidad del anión enolato no permite llevar a cabo la reacción con alquilhaluros que además contengan grupos funcionales como carboxílico, hidroxilo, mercapto, amino o sulfonato. VP con grupos hidroxilo se intentó sintetizar en el pasado por reacción del anión del enolato de la VP con un alquilhaluro alifático que contenía un grupo hidroxilo protegido por un grupo (*tert*-butil-dimetil silano)^{2,3} y posterior desprotección. Sin embargo, solo fue posible obtener mezclas entre compuestos hidroxilados mono- y bi-sustituídos y el rendimiento general de la reacción resultó muy bajo. Además el principal inconveniente de esta ruta sintética es la desprotección del grupo funcional ya que puede provocar la destrucción del doble enlace vinílico de la VP. Por otro lado Bencini et al⁴ sintetizaron por esta ruta los VP derivados 3,3-di(etoxicarbonil)-vinilpirrolidona (DEVP) y 3-(etoxicarbonil)-vinilpirrolidona (EVP) pudiendo convertir DEVP en 1-vinilpirrolidin-2-on-3-carboxilato (VP-COONa) por saponificación del ester y posterior descarboxilación. De manera alternativa Kim et al⁵ y He et al⁶ obtuvieron VP con grupos carboxílicos en posición tres reaccionando la carboxiamida a baja temperatura con dicarbonato (anhídrido de Boc) e hidrolizando posteriormente bajo condiciones suaves para obtener el grupo carboxílico.

Como alternativa, en este trabajo se pretende funcionalizar el monómero VP en una reacción de un único paso haciendo reaccionar el enolato de la VP con compuestos precursores cíclicos de distintas funcionalidades como se muestra en la Figura 1. Mediante apertura de los anillos precursores se busca funcionalizar la VP en una reacción de un solo paso sin necesidad de posteriores desprotecciones.

De esta forma al emplear reactivos de por sí protegidos que al reaccionar dan la funcionalidad buscada se evitaría el paso de la desprotección y por tanto se protege el doble enlace de la VP. El objetivo de este trabajo es la síntesis de nuevas VP funcionalizadas con grupos hidroxilo, mercapto, sulfonato y amina.

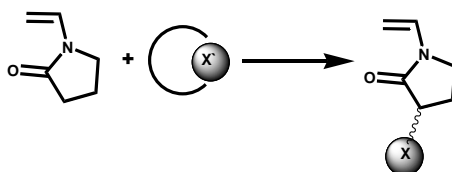


Figura 1: Esquema de la síntesis de VP funcionalizada por apertura de anillo de ciclos precursores de la funcionalidad.

La heterogeneidad composicional que se produce al copolimerizar VP con otros monómeros mencionada en la introducción, se convierte en el caso de preparación de redes de VP en una heterogeneidad en densidad de entrecruzamiento. Para evitar esto, de nuevo la mejor alternativa parece ser el uso de entrecruzantes homólogos a la VP, es decir, compuestos tipo VP-R-VP. Se ha descrito entrecruzantes VP-R-VP en trabajos anteriores¹ con espaciador hidrocarbonado entre las unidades VP. En este trabajo, se pretende obtener un nuevo entrecruzante VP-R-VP, con un espaciador oxietilénico que le confiera mayor hidrofilia que los descritos en la literatura (Figura 2). Además, en trabajos recientes de nuestro grupo⁷ se ha mostrado que se podrían sintetizar pseudo-coretes (redes que incorporan cadenas de distinta naturaleza monomérica) de dos componentes con alta reactividad diferencial si se dispusiera del entrecruzante asimétrico adecuado con dos funciones polimerizables homólogas a ambos monómeros. Por ello, en este trabajo se aborda la síntesis de un entrecruzante asimétrico con homología a VP y a metacrilatos por tener reactividades en polimerización radical muy diferentes (Figura 2).

El entrecruzante asimétrico se sintetizará a partir de una de las VP modificadas mientras que la síntesis del entrecruzantes VP-R-VP ya no se aborda por la ruta de apertura de ciclos mencionada sino por reacción del enolato de la VP con alquilhaluros difuncionales.

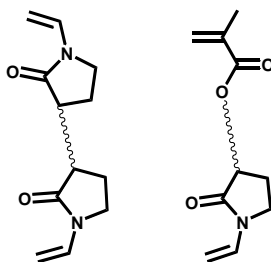


Figura 2: Estructura de los entrecruzantes bi-homólogo a VP y asimétrico VP-Metacrilato deseados

2- Experimental:

2.1. Reactivos:

Todos los reactivos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich y empleados sin purificación extra excepto la vinilpirrolidona (VP) que se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C.

2.2. Síntesis de Monómeros:

Síntesis del compuesto 3-(2-hidroxiethyl)-1-vinil-2-pirrolidona (1)

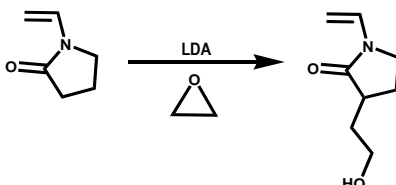


Figura 3: Esquema de síntesis de 3-(2-hidroxiethyl)-1-vinil-2-pirrolidona

Sobre una disolución de diisopropilamida de litio (LDA) (2.0 M, en THF, hexano y etilbenceno, 84.2 mL, 1.8 equivalentes) en 280 mL de THF (tetrahidrofurano) anhidro, se adicionó lentamente (gota a gota) una disolución de VP recién destilada (10.0 mL, 94 mmol, 1.08 equivalentes) en THF anhidro (30 mL) a una temperatura de -78°C y bajo atmósfera inerte.

Completada la adición, la masa de reacción se mantuvo bajo agitación a esa temperatura durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo, se adicionaron lentamente sobre la disolución anterior 4.3 mL (80,7 mmol, 1.0 equivalentes) de una disolución de óxido de etileno (Figura 3).

La disolución resultante se agitó durante una hora a una temperatura de -78°C , después se aumentó la temperatura hasta situarla a -30°C durante dos horas. Transcurrido este tiempo, la masa de reacción se hidrolizó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (2:1; 300 mL). La fracción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2x200 mL) y el combinado de las fases orgánicas se secó con sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4); tras eliminar el sólido inorgánico por filtración, el disolvente se eliminó a presión reducida.

El residuo seco se purificó por cromatografía en gel de sílice, usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{THF}$ (10:1) como eluyente.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.01 (dd, 1H, N-CH= , $J=16.0$ y 9.0 Hz), 4.45 (d, 1H, cis N-CH=CHH , $J=9.0$ Hz), 4.40 (d, 1H, trans N-CH=CHH , $J=16.0$ Hz), 3.92 (br, 1H, OH), 3.78-3.74 y 3.71-3.66 (ambos m, 1H cada m, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 3.54-3.49 y 3.41-3.36 (ambos m, 1H cada m, N-CH_2), 2.72-2.65 (m, 1H, CH-CO), 2.36-2.22 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-OH}$), 1.99-1.92 (m, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CHH}$), 1.82-1.74 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-OH}$), 1.71-1.65 (m, 1H, $\text{N-CH}_2\text{-CHH}$). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ : 176.13 (CO), 129.45 (N-CH=), 95.42 (N-CH=CH_2), 61.48 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 43.50 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 41.83 (CH-CO), 34.39 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$), 25.38 ($\text{CH}_2\text{-CH-CO}$).

Síntesis del compuesto 3-(2-mercaptoethyl)-1-vinil-2-pirrolidona (2)

Este producto se preparó a partir de VP (5.0 mL, 47 mmol, 1.08 equiv) y sulfuro de etileno (2.8 g, 47 mmol, 1.0 equiv) siguiendo la metodología descrita para el compuesto (1) (Figura 4).

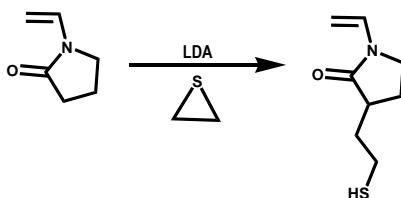


Figura 4: Esquema de síntesis de 3-(2-mercaptoetil)-1-vinil-2-pirrolidona

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.02 (dd, 1H, N-CH= , $J=16.0$ and 9.0 Hz), 4.44 (d, 1H, cis N-CH=CHH , $J=9.0$ Hz), 4.40 (d, 1H, trans N-CH=CHH , $J=16.0$ Hz), 3.53-3.48 (m, 1H, CHH-N), 3.42-3.35 (m, 1H, CHH-N), 2.76-2.62 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-SH}$, CH-CO), 2.36-2.27 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-N}$), 2.18-2.10 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-SH}$), 1.78-1.62 (m, 2H, $\text{CHH-CH}_2\text{-N}$, $\text{CHH-CH}_2\text{-SH}$), 1.37 (t, 1H, SH, $J=7.8$ Hz). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ : 174.64 (CO), 129.08 (N-CH=), 96.10 (N-CH=CH_2), 43.17 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 41.42 (CH-CO), 34.50 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$), 26.15 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 21.55 ($\text{CH}_2\text{-SH}$).

Síntesis del compuesto 3-(3- sulfopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (3)

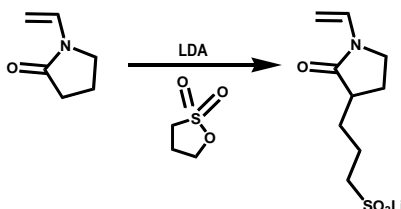


Figura 5: Esquema de síntesis de 3-(3- sulfopropil)-1-vinil-2-pirrolidona

Sobre una disolución de LDA (2.0 M, en THF, hexano y etilbenceno, 42.0 mL, 1.8 equivalentes) en 140 mL de THF anhidro, se adicionó lentamente (gota a gota) una disolución de VP recién destilada (5.0 mL, 46 mmol, 1.0 equivalente) en THF anhidro (10 mL) a una temperatura de -78°C y bajo atmósfera inerte.

Tras esa adición, la masa de reacción se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos a -78°C . Al cabo de este tiempo, se goteó una disolución de 11.7g de 1,3-propanosultona (93 mmol, 2 equivalentes) en 30 mL de THF anhidro. Durante la adición la temperatura no excedió los -76°C (Figura 5).

La disolución resultante se mantuvo agitándose durante tres horas a una temperatura de -78°C ; transcurrido este tiempo se permitió que la temperatura del reactor subiese hasta temperatura ambiente. Se dejó reaccionando durante doce horas. Finalmente la masa de reacción se hidrolizó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (2:1; 300 mL). La fracción acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2x200 mL). La fase acuosa se llevó a sequedad a presión reducida y el residuo sólido se purificó cromatográficamente sobre gel de sílice, empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (4:1).

^1H RMN (D_2O , 300 MHz) δ : 6.79 (dd, 1H, N-CH= , $J=15.9$ y 9.1 Hz), 4.52 (d, 1H, cis N-CH=CHH , $J=15.9$ Hz), 4.48 (d, 1H, trans N-CH=CHH , $J=9.1$ Hz), 3.48-3.44 (m, 1H, CHH-N), 3.38-3.34 (m, 1H, CHH-N), 2.85-2.70 (m,

2H, $\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$), 2.59-2.51 (m, 1H, CH-CO), 2.23-2.14 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-N}$), 1.80-1.59 (m, 4H, $\text{CHH-CH}_2\text{-N}$, $\text{CHH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$), 1.41-1.33 (m, 1H, $\text{CHH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (D_2O , 75.4 MHz) δ : 178.16 (OC-N), 128.56 (N-CH=), 97.76 (N-CH=CH₂), 50.85 ($\text{CH}_2\text{-SO}_3^-$), 43.90 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 42.36 (OC-CH), 29.33 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$), 23.4 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 21.75 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$).

Síntesis del compuesto 3-(2-aminobenzoyl)-1-vinil-2-pirrolidona (4)

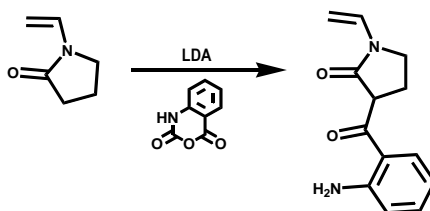


Figura 6: Esquema de síntesis de 3-(2-aminobenzoyl)-1-vinil-2-pirrolidona

Sobre una disolución de LDA (1.8 M, en THF, hexano y etilbenceno, 7.49 mL, 2.2 equivalentes) en 10 mL de THF anhidro, se adicionó lentamente (gota a gota) una disolución de VP recién destilada (0.65 mL, 6.13 mmol, 1.0 equivalente) en THF anhidro (5 mL) a una temperatura de -78°C y bajo atmósfera inerte.

Tras esa adición, la masa de reacción se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos a -78°C . Al cabo de este tiempo, se goteó una disolución de 1g de anhídrido isatoico (6.13 mmol, 1.0 equivalentes) en 35 mL de THF anhidro (Figura 6).

La disolución resultante se mantuvo agitándose durante tres horas a una temperatura de -78°C ; transcurrido este tiempo, se permitió que la temperatura del reactor subiese hasta temperatura ambiente. Se dejó reaccionando durante doce horas. Finalmente la masa de reacción se hidrolizó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:H}_2\text{O}$ (2:1; 300 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2x100 mL) y el combinado de fases orgánicas se secó sobre sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó a presión reducida. Finalmente el residuo sólido se purificó cromatográficamente sobre gel de sílice, empleando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:Dietileter}$ (50:1).

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.93 (d, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 7.28 (t, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 7.07 (dd, 1H, N-CH=, $J=16.0$ y 9.0Hz), 6.70 (t, 1H, CH $J=4.0\text{Hz}$), 6.65 (d, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 6.30 (br, 2H, NH_2), 4.58 (dd, 1H, CO-CH-CO, $J=5.2$ y $J=9.6\text{Hz}$), 4.45 (d, 1H, cis N-CH=CHH, $J=9.0\text{Hz}$), 4.40 (d, 1H, trans N-CH-CHH, $J=16.0\text{Hz}$), 3.68 (m, 1H, N-CHH), 3.55 (td, N-CHH, $J=4.4$ y $J=9.2\text{Hz}$), 2.63 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 2.32 (m, 1H, N-CH₂-CHH). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 196.91 (CO), 169.40 (CO-N), 151.25 (C-NH₂), 134.98 (CH-CH-C-NH₂), 132.72 (N-CH=), 129.35 (CH-C-CO), 117.17 (CH-CH-C-CO), 117.01 (C-CO), 115.98 (CH-C-NH₂), 95.32 ($\text{CH}_2=\text{CH-N}$), 51.05 (CO-CH-CO), 43.61 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 22.15 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$).

Capítulo 1

Síntesis del compuesto 3-(2-metilaminobenzoi)-1-vinil-2-pirrolidona (5)

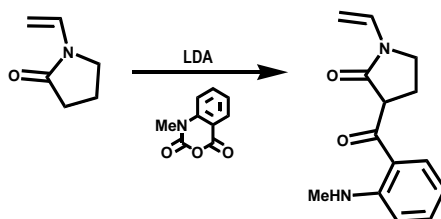


Figura 7: Esquema de síntesis de 3-(2-metilaminobenzoi)-1-vinil-2-pirrolidona

Este producto se obtuvo a partir de VP (0.53 mL, 5.08 mmol, 1.0 equiv) y anhídrido N-metil-isatoico (5.64 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida empleando una disolución de LDA (1.8 M, en THF, hexano y etilbenceno, 7.49 mL, 2.2 equivalentes). La vía que se empleó es la descrita para el producto (4) (Figura 7).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 8.80 (br, 1H, NH), 7.93 (d, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 7.40 (t, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 7.07 (dd, 1H, N-CH=, $J=16.0$ y 9.0 Hz), 6.69 (d, 1H, CH $J=4.0\text{Hz}$), 6.64 (d, 1H, CH, $J=4.0\text{Hz}$), 4.58 (dd, 1H, CO-CH-CO, $J=5.2$ y $J=9.6\text{Hz}$), 4.49 (d, 1H, cis N-CH=CHH, $J=9.0\text{Hz}$), 4.44 (d, 1H, trans N-CH=CHH, $J=16.0\text{Hz}$), 3.67 (m, 1H, N-CHH), 3.55 (td, N-CHH, $J=4.4$ y $J=9.2\text{Hz}$), 2.86 (s, CH_3), 2.61 (m, 1H, N-CH₂-CHH), 2.33 (m, 1H, N-CH₂-CHH). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 196.91 (CO), 169.40 (CO-N), 153.06 (C-NH₂), 135.94 (CH-CH-C-NH₂), 133.62 (N-CH=), 129.64 (CH-C-CO), 114.46 (CH-CH-C-CO), 114.13 (C-CO), 111.56 (CH-C-NH₂), 95.46 (CH₂=CH-N), 51.15 (CO-CH-CO), 43.89 (CH₂-N), 29.56 (CH₃), 22.67 (CH₂-CH₂-N).

Síntesis del compuesto metil-aziridina (6)

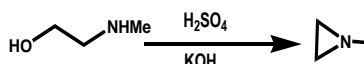


Figura 8: Esquema de síntesis de metil-aziridina

En un matraz de 500 mL se añadieron 50 mL (625 mmol, 1.0 equiv) de metilaminoetanol y se introdujo en un baño de hielo con agitación; seguidamente se adicionó lentamente 39.97 mL (750 mmol, 1.2 equiv) de H_2SO_4 . Se dejó enfriar hasta T^a ambiente y posteriormente se calentó a $140\text{-}150^\circ\text{C}$ con agitación constante y a vacío durante dos horas. Posteriormente se dejó enfriar y se añadieron 85 mL de H_2O y una disolución de KOH (170 g en 200 mL de H_2O) (Figura 8). La disolución resultante se calentó a 100°C y se destiló sin vacío recogiendo el producto en un matraz sumergido en nitrógeno líquido debido a su bajo punto de ebullición ($24\text{-}25^\circ\text{C}$).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.0 (t, 2H, CH_2), 1.7 (t, 2H, CH_2), 2.26 (s, 1H, NH).

Síntesis del compuesto aziridina (7)

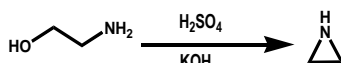


Figura 9: Esquema de síntesis de aziridina

Este producto se obtuvo a partir de aminoetanol (50 mL). La vía que se empleó fue la descrita para el producto **(6)** (Figura 9).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1.1 (s, 1H, NH), 1.61 (s, 4H, CH_2).

Síntesis del compuesto *tosil-aziridina* (8)

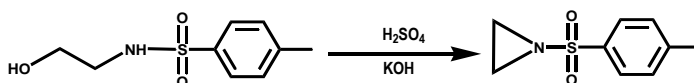


Figura 10: Esquema de síntesis de *tosil-aziridina*

Este producto se obtuvo a partir de tosilaminoetanol (50 mL). La vía que se empleó fue la descrita para el producto **(6)** (Figura 10).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 2.45 (s, 3H, CH_3), 3.05 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 7.34 (m, 2H, CH-C-CH_3), 7.59 (m, CH-C-S).

Síntesis del compuesto 3-(2-metilaminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona (9)

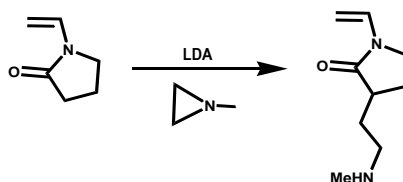


Figura 11: Esquema de síntesis de 3-(2-metilaminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona

Este producto se intentó obtener a partir de VP (0.93 mL, 8.77 mmol, 1.0 equiv) y metil-aziridina **(6)** (0.5g, 8.77 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto **(1)** sin obtener resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto **(4)** y tampoco se produjo la reacción (Figura 11).

Síntesis del compuesto 3-(2-aminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona (10)

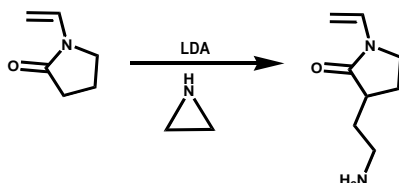


Figura 12: Esquema de síntesis de 3-(2-aminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona

Capítulo 1

Este producto se intentó obtener a partir de VP (0.93 mL, 8.77 mmol, 1.0 equiv) y aziridina (**7**) (0.37g, 8.77 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto (**1**) sin obtener resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto (**4**) y tampoco se produjo la reacción (Figura 12).

Síntesis del compuesto 3-(2-tosilaminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona (**11**)

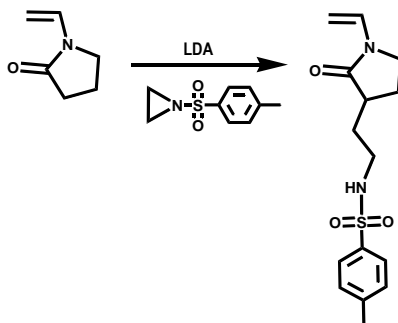


Figura 13: Esquema de síntesis de 3-(2-tosilaminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona

Este producto se intentó obtener a partir de VP (0.25 mL, 2.39 mmol, 1.09 equiv) y tosil-aziridina (**8**) (0.43 g, 2.19 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto (**1**) sin obtener resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto (**4**) y tampoco se produjo la reacción (Figura 13).

Síntesis del compuesto 3-(1-oxo-2-aminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona (**12**)

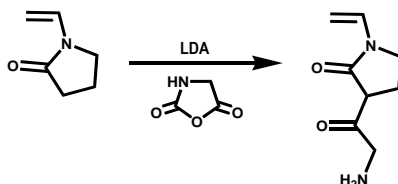


Figura 14: Esquema de síntesis de 3-(1-oxo-2-aminoetil)-1-vinil-2-pirrolidona

Este producto se intentó obtener a partir de VP (0.1 mL, 0.93 mmol, 1.0 equiv) y 2,5-oxazolidinediona (0.11 g, 1.12mmol, 1.2 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto (**1**) sin obtener resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto (**4**) y tampoco se produjo la reacción (Figura 14).

Síntesis del compuesto 3-(1-oxo-3-aminopropil)-1-vinil-2-pirrolidona (**13**)

Este producto se intentó obtener a partir de VP (0.23 mL, 2.15 mmol, 1.0 equiv) y 2-azetidona (0.15 g, 2.15 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto (**1**) sin obtener

resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto **(4)** y tampoco se produjo la reacción (Figura 15).

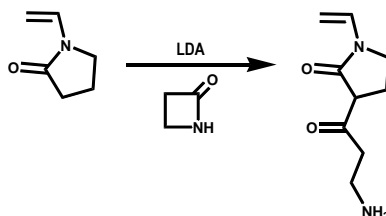


Figura 15: Esquema de síntesis de 3-(1-oxo-3-aminopropil)-1-vinil-2-pirrolidona

Síntesis del compuesto 3-(1-oxo-4-metilaminobutil)-1-vinil-2-pirrolidona (14)

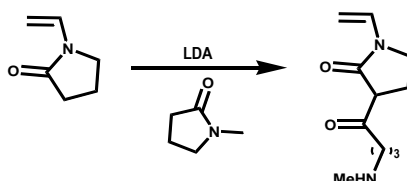


Figura 16: Esquema de síntesis de 3-(1-oxo-4-metilaminobutil)-1-vinil-2-pirrolidona

Este producto se intentó obtener a partir de VP (1.11 mL, 10.4 mmol, 1.0 equiv) y N-metilpirrolidona (1 mL, 10.4 mmol, 1.0 equiv) como productos de partida. La vía que se empleó fue la descrita para el producto **(1)** sin obtener resultado. Posteriormente se probó la vía empleada para obtener el compuesto **(4)** y tampoco se produjo la reacción (Figura 16).

2.3. Síntesis de Entrecruzantes:

Síntesis del entrecruzante simétrico bi-homólogo a VP (15)

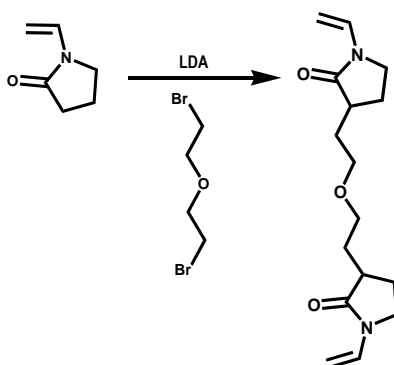


Figura 17: Esquema de síntesis del entrecruzante simétrico bi-homólogo a VP

Capítulo 1

Sobre una disolución de LDA (2.0 M, en THF, hexano y etilbenceno, 26 mL, 4.0 equivalentes) en 30 mL de THF anhidro, se adicionó lentamente (gota a gota) una disolución de VP recién destilada (5 mL, 46.8 mmol, 4.0 equivalente) en THF anhidro (15 mL) a una temperatura de -78°C bajo atmósfera inerte.

Tras esa adición, la masa de reacción se mantuvo bajo agitación durante dos horas a -78°C . Al cabo de este tiempo, se goteó una disolución de 2-bromoetileter (11.7 mmol, 1.0 equivalentes) en 10 mL de THF anhidro (Figura 17).

La disolución resultante se mantuvo agitándose durante dos horas a una temperatura de -78°C ; transcurrido este tiempo, se permitió que la temperatura del reactor subiese hasta temperatura ambiente. Se dejó reaccionando durante doce horas. Finalmente la masa de reacción se hidrolizó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (2:1; 300 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2x100 mL) y el combinado de fases orgánicas se secó sobre sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) y se evaporó a presión reducida. Finalmente el residuo sólido se purificó cromatográficamente sobre gel de sílice, empleando como eluyente CH_2Cl_2 :Dietileter (20:1).

^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.09 (dd, 2H, N-CH=, $J=16.0$ y 8.9 Hz), 4.41 (m, 4H, N-CH=CHH), 3.49 (m, 8H, N-CH₂ y O-CH₂), 2.63 (m, 2H, CO-CH), 2.31, 2.16 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 1.77, 1.62 (m, 4H, O-CH₂-CH₂). Espectro disponible en el apéndice 1.

Síntesis del entrecruzante asimétrico (16)

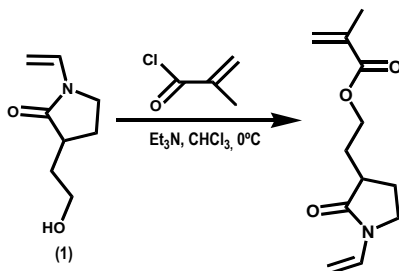


Figura 18: Esquema de síntesis del entrecruzante asimétrico con homología a VP y metacrilatos

Se añadieron secuencialmente bajo agitación cloruro de metacrililoilo (1mL en 20mL de CHCl_3) y trietilamina (1mL en 20mL de CHCl_3) a una disolución de (1) (1mL en 40mL de CHCl_3) enfriada a 0°C . Tras dos horas a esta temperatura, la reacción se hidrolizó y se lavó dos veces con NaHCO_3 (1M), posteriormente se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice empleando CH_2Cl_2 como eluyente (Figura 18).

^1H RMN (CDCl_3) δ : 7.01 (dd, 1H, N-CH=, $J=15.9$ and 9.0 Hz), 6.02 (s, 1H, CO-C = CHH), 5.50 (s, 1H, CO-C = CHH), 4.38 (d, 1 H, cis N-CH=CHH, $J=9.0$ Hz), 4.34 (d, 1H, trans N-CH=CHH, $J=15.9$ Hz), 4.25–4.19 (m, 2H, CH₂-O-), 3.49–3.44 (m, 1H, CHH-N), 3.36–3.29 (m, 1H, CHH-N), 2.60–2.54 (m, 1H, CH-CO), 2.34–2.16 (m, 1H, CHH-CH₂-O-CO), 1.87 (s, 3H, CH₃), 1.79–1.61 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 1.28–1.21 (m, 1H, CHH-CH₂-O-CO). Espectro disponible en el apéndice 1.

^{13}C RMN (CDCl_3) δ : 174.1 (CO-N), 167.1 (CO-O), 136.0 (CO-C=), 129.3 (N-CH=), 125.5 (CO-C=CH₂), 94.3 (N-CH=CH₂), 62.5 (CH₂-O), 42.7 (CH₂-N), 39.7 (CH-CO), 30.1 (CH₂-CH₂-O), 24.5 (CH₂-CH₂-O), 18.2 (CH₃).

2.4. Equipos:

Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 (300 y 75.4 MHz, respectivamente) en CDCl_3 o D_2O con TMS (tetrametilsilano) como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala δ relativos a TMS.

3-Resultados y discusión:

La nueva ruta sintética mostrada en la Figura 19 para la funcionalización de la VP por apertura de anillo de ciclos precursores proporciona un método adecuado para conseguir distintas funcionalidades con amplio potencial para diferentes aplicaciones.

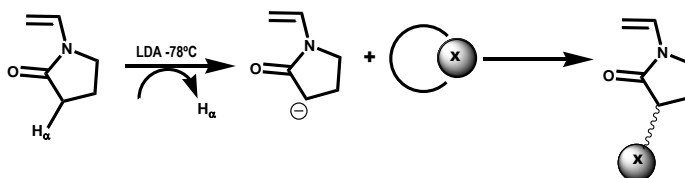
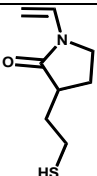

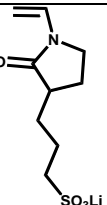
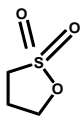
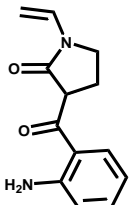
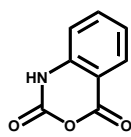
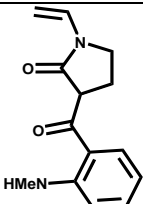
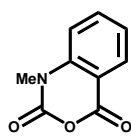
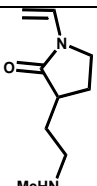

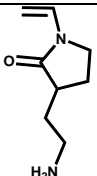

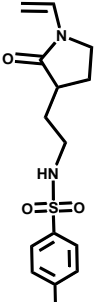
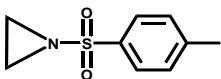


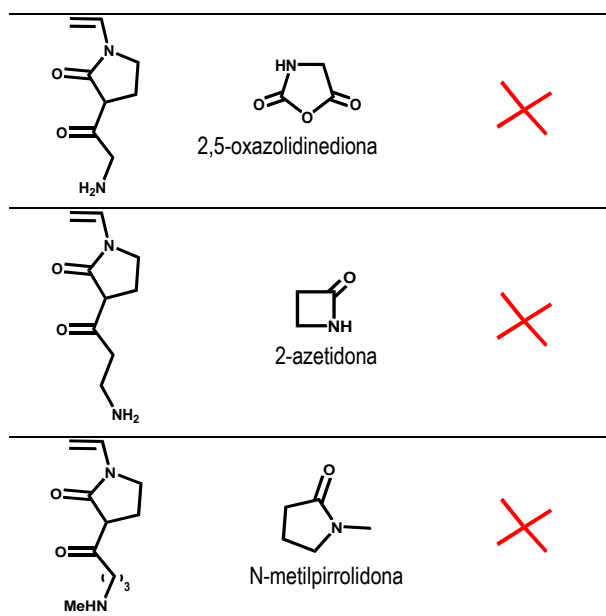
Figura 19: Síntesis de VP funcionalizada por apertura de anillo de ciclos precursores de la funcionalidad

Se ha obtenido el enolato de la carboxiamida abstrayendo el protón en α de la VP empleando como base LDA por ser la óptima según estudios de nuestro grupo⁸. La funcionalización de la VP se ha conseguido mediante ataque nucleófilo del enolato al reactivo precursor de la funcionalidad seleccionado y la correspondiente apertura de anillo del ciclo susceptible de este ataque. En la selección de los ciclos precursores lo que se ha buscado es conseguir funcionalidades tipo alcohol, tiol, sulfo, amina primaria y amina secundaria. En la Tabla 1 se resumen las distintas reacciones que se han realizado para sintetizar los monómeros objetivo a partir de los ciclos elegidos.

Tabla 1: Resumen de los monómeros objetivo, ciclos precursores de los mismos y rendimiento de las reacciones.

Monómero	Ciclo precursor	Rendimiento (%)
	 epóxido	28

	 tirano	27
	 1,3-propanosultona	50
	 anhídrido isatoico	40
	 N-metil-isatoico	45
	 metil-aziridina	✗
	 aziridina	✗
	 tosilaziridina	✗



En el caso de heterociclos de 3 unidades como epóxido o tirano la fuerza conductora principal de la reacción es la alta tensión anular, por ser ciclos muy tensionados. A partir de ambos ciclos se han obtenido unidades monoméricas de VP funcionalizada con grupos hidroxilo (V_{OH}) y mercapto (V_{SH}) con un espaciador corto de dos grupos metilénicos entre el grupo funcional y la VP. El rendimiento de estas reacciones es en general bajo.

La tensión anular es la que en un principio se podría aprovechar también en el caso de aziridinas. Sin embargo, estas reacciones no han tenido lugar en ninguna de las condiciones probadas. Esto probablemente es debido a que comparados con el epóxido o el tirano las aziridinas son menos reactivas al ataque nucleófilo del enolato. De hecho, la aziridina polimeriza muy bien por vía catiónica pero no por aniónica⁹⁻¹⁰. Se ha intentado aumentar la electrofilia de la aziridina por N-sustituciones con grupos como el tosilo que al retirar carga de la amina favorecen su carácter electrófilo pero no se ha conseguido resultados positivos independientemente de la N-sustitución que tengan.

La apertura de anillos por ataque nucleófilo del enolato se ha podido llevar también a cabo con ciclos más grandes como sultonas o carboxianhídridos en los que la tensión anular ya no es necesariamente la fuerza conductora de la reacción sino que la susceptibilidad electrófila asociada al grupo funcional es la responsable principal del ataque y de la apertura. En este caso, se han obtenido espaciadores más largos y los rendimientos generales de las reacciones están entre el 40-50%. La propanosultona ha permitido obtener VP funcionalizada con grupos sulfonato de litio (V_S). Usando carboxianhídridos gracias a la susceptibilidad electrófila del carbonilo y a su posterior descarboxilación se ha conseguido obtener VP funcionalizada con amina aromática primaria (V_N) y secundaria (V_{NMe}). Para la síntesis de V_N ha sido necesario añadir un exceso de base puesto que el protón del NH del carboxianhídrido también es susceptible de sustraerse por la base desactivando el enolato de la VP. La 2,5-oxazolidinediona, que es el carboxianhídrido más simple con el que se podría obtener VP funcionalizada con amina alifática, no es soluble en THF (disolvente empleado en la síntesis) por lo que se ha realizado la reacción en fase heterogénea sin obtener ningún resultado.

Capítulo 1

Al intentar la reacción con lactamas en las que la susceptibilidad electrófila asociada al grupo funcional podría haber sido la fuerza conductora tampoco se han obtenido resultados positivos ya que probablemente su electrofilia es baja.

En cuanto al gradiente de temperatura, ha sido necesario dejar subir las reacciones hasta temperatura ambiente para que alcanzasen su mayor rendimiento, excepto en los casos del epóxido y el tirano donde la reacción se detiene a -30°C para evitar su degradación. Probablemente por este motivo son las reacciones con rendimientos más bajos.

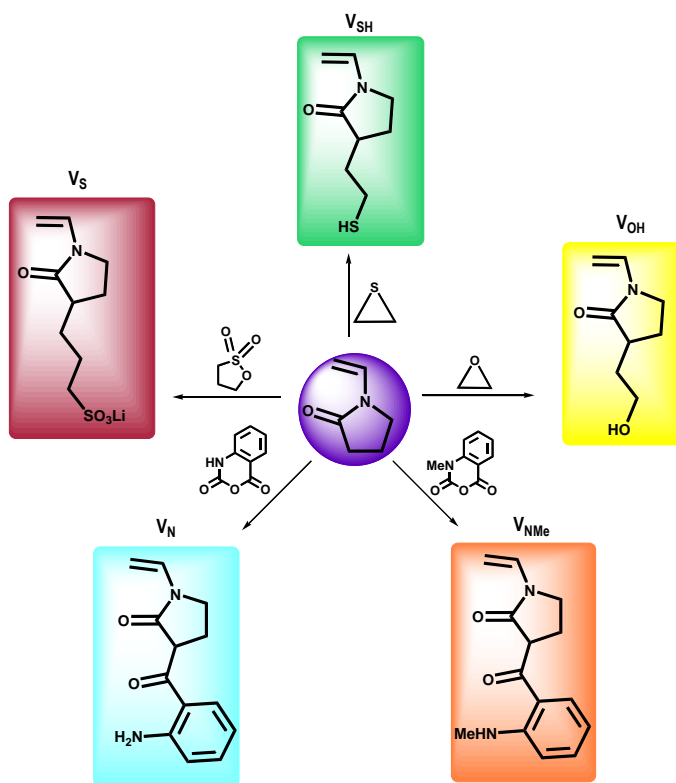


Figura 20: Esquema de las nuevas VP funcionalizadas sintetizadas y de los ciclos precusores de la funcionalidad que las originan.

En conclusión, gracias a esta nueva ruta sintética se ha conseguido funcionalizar VP con tioles (V_{SH}), alcoholes (V_{OH}), grupos sulfonatos (V_S) y aminas aromáticas primarias (V_N) y secundarias (V_{NMe}). En la Figura 20 se han resumido los monómeros sintetizados con éxito así como los reactivos cíclicos precusores de las distintas funcionalidades. En esta figura se incluye la nomenclatura que tendrán los nuevos monómeros en los sucesivos capítulos de la tesis. A lo largo de la tesis se han empleado los monómeros V_{OH}, V_S, y V_N. V_{SH} es un monómero muy interesante por el grupo tiol que posee. Obtener PVP funcionalizada con grupos SH puede ser muy atractivo en bioconjugación o en la preparación de materiales (como en la nucleación de nanopartículas de Au u otros metales). Sin embargo, la preparación de estos polímeros mediante polimerización radical

convencional requiere la protección previa del grupo SH, ya que este actúa como fuerte agente de transferencia. Ya que esta tesis se ha centrado en la obtención de copolímeros mediante sencilla copolimerización radical de VP y sus derivados, no se ha abordado la química de protección/polimerización/desprotección necesaria para obtener PVP funcionalizada con grupos SH, aunque se pretende hacerlo en el grupo en un futuro próximo.

La síntesis de un entrecruzante bi-homólogo a VP (en adelante en la tesis entrecruzante VV-Figura 21) ha sido posible mediante la abstracción del protón en α de dos unidades VP y el ataque nucleófilo de ambas a un derivado dibromado. El espaciador entre las dos unidades VP del entrecruzante está formado por una cadena oxietilénica que le proporciona mayor hidrofilia al entrecruzante sintetizado en comparación con la cadena netamente hidrocarbonada de entrecruzantes similares descritos en la literatura como se ha mencionado en la introducción. Este entrecruzante se empleará en los capítulos 2, 3 y 6.

La síntesis del entrecruzante asimétrico con homología tanto a VP como a metacrilatos (en adelante en la tesis entrecruzante MV, Figura 21) ha sido posible gracias a la síntesis previa del monómero V_{OH} . Este entrecruzante abre la opción de sintetizar pseudo co-redes en las que se unan cadenas con distinta naturaleza atendiendo a la doble homología de enlaces que presenta el entrecruzante⁷ como se analizará en el capítulo 6.

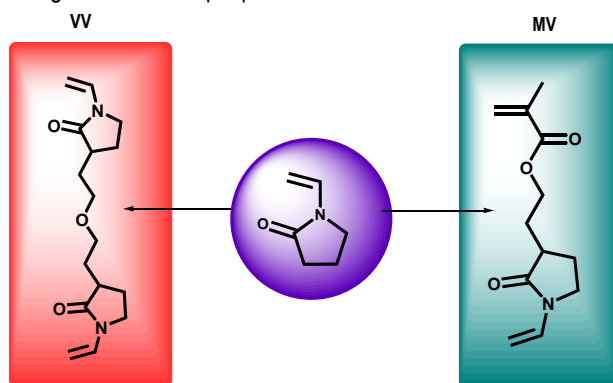


Figura 21: Esquema de los nuevos entrecruzantes bi-homólogo (VV) y asimétrico (MV).

4-Conclusiones:

La síntesis de VPs funcionalizadas por apertura de anillo de ciclos precursores permite obtener monómeros funcionalizados en una síntesis de un único paso sin posteriores desprotecciones.

A partir de esta ruta de síntesis se han podido obtener VPs funcionalizadas con grupos alcohol (V_{OH}), tiol (V_{SH}), sulfonato (V_S), amina aromática primaria (V_N) y amina aromática secundaria (V_{NMe}).

Los diversos intentos realizados para obtener VP funcionalizada con amina alifática, por esta ruta de apertura de anillo, no han resultado eficientes por lo que en el futuro se estudiará la obtención de este monómero por otras rutas de síntesis.

Se han podido preparar nuevos entrecruzantes simétrico (VV) y asimétrico (MV) este último a partir del monómero V_{OH} .

5- Bibliografía:

- 1 White, L., Jönson, S., Hoyle, C. & Mathias, L. Synthesis of 3-alkylated-1-vinyl-2-pyrrolidones and preliminary kinetic studies of their photopolymerizations. *Polymer* **40**, 6597-6605 (1999).
- 2 Engström, J. U. A. & Helgee, B. Hydrophilic Polymer Supports for Solid-Phase Synthesis: Hydroxyl-Functional Beads of Poly (vinylpyrrolidone). *Journal of Combinatorial Chemistry* **8**, 355-360 (2006).
- 3 Engström, J. U. A., Helgee, B., Sung, S. D. & Bergbreiter, D. E. Novel Densely Alkylated Hydroxyl-Functional Polyvinylpyrrolidone Showing Phase-Selective Solubility. *Macromolecular Chemistry and Physics* **207**, 1062-1069 (2006).
- 4 Bencini, M. *et al.* Synthesis of 3, 3-Di (ethoxycarbonyl)-1-vinylpyrrolidin-2-one and Determination of Its Reactivity Ratios with 1-Vinylpyrrolidin-2-one. *Macromolecules* **38**, 8211-8219 (2005).
- 5 Kim, J. B., Jung, M. H. & Chang, K. H. (Google Patents, 1998).
- 6 He, W., Gonsalves, K. E., Pickett, J. H. & Halberstadt, C. Synthesis, characterization, and preliminary biological study of poly (3-(tert-butoxycarbonyl)-N-vinyl-2-pyrrolidone). *Biomacromolecules* **4**, 75-79 (2003).
- 7 Reinecke, H. & Gallardo, A. Symmetric Versus Asymmetric "Homologous" Vinylic Cross-Linkers in Two-Components Networks: Formation of Pseudo-Conetworks or Pseudo-IPNs. *Macromolecular Theory and Simulations* **18**, 25-29 (2009).
- 8 Pérez Perrino, M., Navarro, R., Gómez Tardajos, M., Gallardo, A. & Reinecke, H. "One-pot" Synthesis of 1-Vinyl-2-pyrrolidone with Protic Functional Groups in 3-Position. *Macromolecular Chemistry and Physics* **210**, 1973-1978 (2009).
- 9 Goethals, E., Schacht, E., Bruggeman, P. & Bossaer, P. Cationic Polymerization of Cyclic Amines. *ACS Sym Ser* **59**, 1-12 (1977).
- 10 Kubisa, P. & Penczek, S. Cationic activated monomer polymerization of heterocyclic monomers. *Progress in Polymer Science* **24**, 1409-1437 (1999).

Capítulo 2

**Relevancia de la homología del doble enlace
polimerizable en la copolimerización radical de
vinilpirrolidona**

1-Introducción:

1.1. Polimerización radical convencional

La síntesis de nuevos materiales basados en VP planteada en este trabajo de tesis se va a llevar a cabo por copolimerización radical convencional de VP con otros monómeros homólogos (derivados de VP) y/o metacrilatos, a veces en presencia de entrecruzantes portadores también de diferentes homologías hacia VP y/o metacrilatos. La polimerización radical es una de las polimerizaciones en cadena más estudiadas en la que las especies activas son radicales (o más bien macrorradicales)¹⁻⁶. Los radicales son moléculas orgánicas que contienen un electrón desapareado y que generalmente se consideran especies inestables y reactivas. Entre los diferentes tipos de polimerización en cadena, la polimerización radical convencional (llamada así para diferenciarla de la controlada) es el proceso más utilizado desde el punto de vista de producción industrial, ya que es una técnica relativamente fácil, que no requiere una purificación exhaustiva de reactivos (excepto la eliminación de oxígeno disuelto, habitualmente necesaria), y generalmente da lugar a polímeros de alto peso molecular en condiciones relativamente suaves, con temperaturas de polimerización entre ambiente y 200°C. Se puede aplicar en diferentes procesos como en masa, en solución, en suspensión o en emulsión. En este trabajo se han usado la polimerización en solución y en masa para preparar respectivamente cadenas lineales y redes. Además es posible polimerizar gran número de monómeros funcionales aunque la familia de monómeros más importante en polimerización radical es sin duda la de los alquenos, principalmente aquellos con sustitución 1 ó 1,1 (derivados vinílicos) entre los que se encuentran la VP -y derivados- y los metacrílicos usados en este trabajo.

La polimerización radical convencional se puede describir de acuerdo al esquema básico de la Figura 1. Es necesaria una etapa de iniciación en la que los iniciadores dan lugar a los llamados radicales primarios (en el esquema Ini^*). Este proceso necesita de algún tipo de aporte energético como el térmico o el lumínico usados en este trabajo para preparar las cadenas lineales o las redes mediante iniciación térmica o fotopolimerización respectivamente. Estos radicales primarios pueden originar una reacción en cadena, habitualmente rapidísima, en la que se adicionan de forma sucesiva decenas, centenares o miles de moléculas de monómero, en la etapa denominada propagación. En el caso concreto de los derivados vinílicos en cada una de estas adiciones de monómero, el macrorradical en crecimiento ataca regioselectivamente al carbono del doble enlace no sustituido, se regenera el radical activo en el otro carbono que pasa a ser el nuevo extremo de cadena. El resultado es que se insertan los dos carbonos de dicho doble enlace en el esqueleto macromolecular. Esta reacción en cadena es la etapa definitoria de la polimerización y tiene lugar hasta que por algún motivo el extremo activo se desactiva, formándose una cadena 'muerta' o desactivada que forma parte del material final. Una de las posibilidades de desactivación es mediante reacción birradicalaria de dos macrorradicales, en la llamada etapa de terminación. La reactividad de esta reacción radicalaria es altísima, y por tanto es una desactivación intrínseca a este tipo de polimerización pues los macrorradicales son los protagonistas de la reacción y deben estar en el medio.

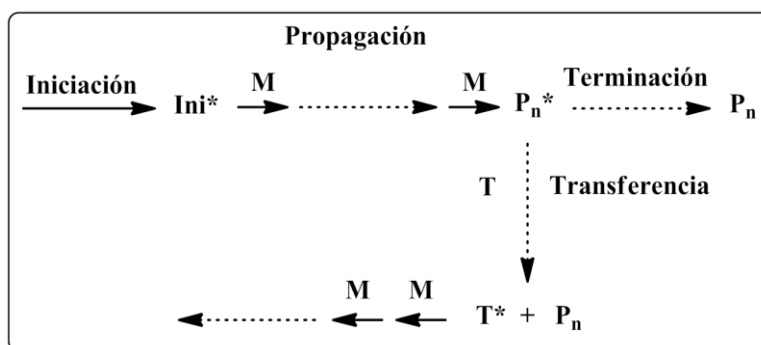
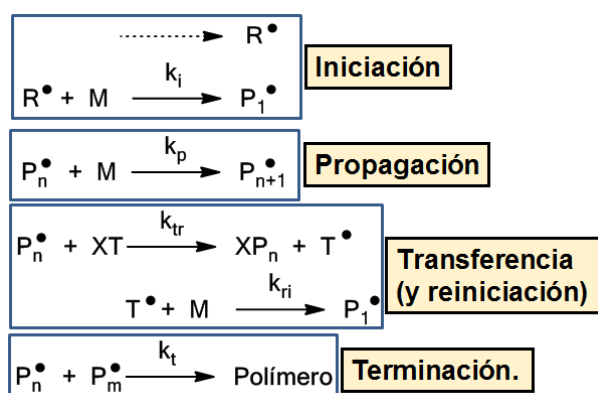


Figura 1: Etapas de la polimerización radical, donde Ini^* =centro activo primario, M =monómero, P_n^* =centro activo en crecimiento, P_n =cadena "muerta" de polímero, T =agente transferencia, T^* =centro activo en crecimiento tras la transferencia.

En esta etapa de terminación los macrorradicales involucrados se desactivan y no se produce ningún otro hecho que influya en la reacción. Hay otra posibilidad de desactivación mecanísticamente muy diferente, la transferencia, en la cual una cadena en crecimiento se desactiva al reaccionar con un compuesto T (agente de transferencia) pero en este caso en el proceso se forma un nuevo radical derivado de T (T^*) capaz de reiniciar un nuevo proceso de reacción en cadena. El proceso de transferencia es muy común en polimerización radical convencional y en realidad cualquier especie presente en el medio, como el disolvente o el propio monómero, puede actuar como agente de transferencia. Obviamente a mayor extensión del proceso menor peso molecular.

Las expresiones cinéticas de los diferentes procesos se pueden expresar así:



donde R^{\bullet} y P_n^{\bullet} son los radical primarios y los radicales en crecimiento respectivamente, y k_i , k_p , k_{tr} , k_{ri} y k_t son las constantes cinéticas de los diferentes procesos (iniciación, propagación, transferencia, reiniciación y terminación).

La velocidad de cada proceso viene dada por las expresiones cinéticas características (constante cinética por la concentración de cada reactivo). Así, las velocidades de propagación y de transferencia vienen dadas por:

$$R_p = k_p [P_n^{\bullet}] [M] \quad (1)$$

$$R_{tr} = k_{tr} [P_n \bullet][T] \quad (2)$$

El crecimiento de la cadena depende del balance entre aquellos procesos que la hacen crecer (propagación) y aquellos que la desactivan (terminación y/o transferencia). Suponiendo que hay solo un tipo de transferencia el grado de polimerización vendría dado por:

$$\overline{DP}_n = \frac{R_p}{R_t + R_{tr}} \quad (3)$$

donde \overline{DP}_n es el grado de polimerización, es decir, el número promedio de unidades por cadena y R_p , R_t y R_{tr} son las velocidades de los procesos de propagación, terminación y transferencia (en moles por unidad de tiempo).

De esta expresión se llega fácilmente a la ecuación de Mayo:

$$\frac{1}{\overline{DP}_n} = \frac{R_t}{R_p} + \frac{R_{tr}}{R_p} = \frac{1}{\overline{DP}_{n0}} + \frac{k_{tr}}{k_p} \frac{[T]}{[M]} = \frac{1}{\overline{DP}_{n0}} + C_T \frac{[T]}{[M]} \quad (4)$$

donde \overline{DP}_{n0} es el peso molecular de referencia de una reacción sin transferencia (desactivación solo por terminación) y C_T (la relación de k_{tr} y k_p) es la constante de transferencia.

De forma general esta ecuación varía con la conversión en una reacción en un reactor discontinuo y las cadenas no son uniformes en tamaño, es decir, la polimerización radical convencional da lugar típicamente a mezclas de cadenas polidispersas (polidispersidades superiores a 2). Se puede definir el 'acumulado' de polímero como el material que recoge las cadenas formadas a diferentes tiempos y que en este caso presenta una distribución de tamaños típicamente ancha.

En el caso particular de transferencia al monómero:

$$\frac{1}{\overline{DP}_n} = \frac{1}{\overline{DP}_{n0}} + C_T \quad (5)$$

En este caso concreto, si la desactivación está dominada por la transferencia al monómero, el peso molecular disminuye significativamente y la polidispersidad puede ser inferior a la típica.

1.2. Copolimerización radical

Como se ha mencionado antes, los materiales descritos en este trabajo se han obtenido mediante copolimerización radical de VP con otros monómeros, es decir, mediante polimerización simultánea de ambos (Figura 2). La polimerización simultánea de dos o más monómeros da lugar a copolímeros estadísticos, llamados así porque la distribución de unidades a lo largo del esqueleto macromolecular obedece alguna ley estadística (Figura 3)⁷.

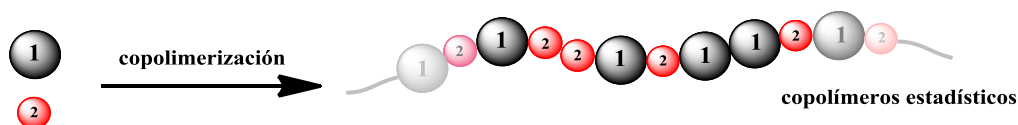


Figura 2. Representación esquemática de una copolimerización simultánea de dos monómeros 1 y 2 y de la formación de una cadena de copolímero estadístico.

Esta distribución estadística está relacionada obviamente con el modelo de propagación, es decir, con el modo en que se incorporan los dos componentes a las cadenas durante la propagación. El modelo de propagación históricamente más utilizado ha sido el terminal², que es el que considera que la reactividad del macrorradical en crecimiento depende de la naturaleza de la unidad *terminal* (Figura 3). Durante muchos años se pensó que la mayoría de las copolimerizaciones binarias se regían adecuadamente por el modelo terminal, a pesar de ciertas discrepancias a la hora de predecir parámetros de velocidad de reacción. Sin embargo, desde los experimentos pioneros de Fukuda en 1985⁸ (medida de constantes absolutas), hoy día está aceptado que – en la gran mayoría de las copolimerizaciones – el modelo físicamente válido para explicar la totalidad de la reacción es el penúltimo (Figura 3), el cual considera que la reactividad del macrorradical está definida no sólo por la naturaleza de la unidad terminal sino también por la de la *penúltima*. Sin embargo, es un modelo difícil de usar y a nivel composicional la reacción suele describir adecuadamente usando el modelo terminal. En otras palabras, aunque el modelo penúltimo es el físicamente válido, se sigue utilizando el terminal para describir composicionalmente de la reacción¹. En este trabajo se va a hacer este tipo de análisis y por ello se va a usar el modelo terminal y su ecuación de composición.

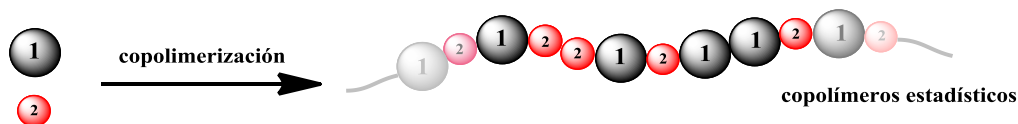


Figura 3: Esquema de dos tipos de macrorradicales mostrando las unidades terminal y penúltima usadas en los correspondientes modelos.

Dentro del modelo terminal tomando como ejemplo, para una copolimerización binaria de 1 y 2, el macrorradical en crecimiento acabado en 1, éste tendrá diferente reactividad hacia cada uno de los dos monómeros. Si es más reactivo hacia 1, significa que será más probable encontrar la secuencia 11 que la 12 en la cadena polimérica. En otras palabras, este modelo de propagación da lugar a cadenas cuya distribución de unidades siguen una estadística de Markov de orden 1: la probabilidad de encontrar una unidad depende de la naturaleza de la unidad vecina. El modelo penúltimo en cambio da lugar a una estadística de Markov de orden 2: la probabilidad de encontrar una unidad depende de la naturaleza de las dos unidades inmediatamente vecinas.

Ya en 1944 Mayo y Lewis⁹ y otros¹⁰⁻¹¹ llevaron a cabo simultáneamente un desarrollo cinético básico del modelo terminal para una copolimerización binaria de dos monómeros genéricos 1 y 2, de acuerdo al esquema de la Figura 4.

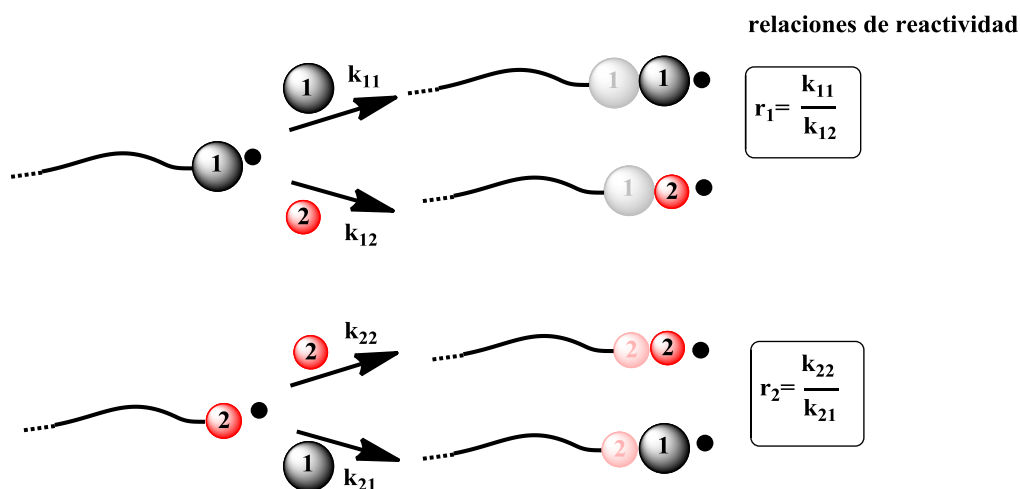


Figura 4: Posibles reacciones de propagación y relaciones de reactividad según el modelo terminal.

Se definen por tanto dos tipos de macrorradicales, el acabado en 1 y el acabado en 2. Cada uno de ellos tiene una diferente reactividad con los dos monómeros. Hay por tanto cuatro posibles propagaciones, cada una de ellas con su constante característica. Para cada macrorradical se define una 'relación de reactividad' como la relación de reactividades hacia el monómero homólogo y el heterólogo (homopropagación y propagación cruzada), expresados como la relación de constantes. Así, r_1 , la relación de reactividad del macrorradical acabado en 1, viene dado por k_{11}/k_{12} . Una r_1 (ó r_2) mayor o menor que uno significa que el macrorradical acabado en 1 (ó 2) es más o menos reactivo hacia el monómero homólogo 1 (ó 2) que hacia el heterólogo 2 (ó 1).

Se llegó a esta ecuación de composición del modelo terminal (la llamada ecuación de Mayo-Lewis):

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1](r_1[M_1] + [M_2])}{[M_2]([M_1] + r_2[M_2])} \quad (6)$$

donde $[M_1]$ y $[M_2]$ son las concentraciones molares de los monómeros 1 y 2.

Ésta es una ecuación diferencial que sólo da información de un determinado instante de la reacción. Se puede escribir en forma de fracciones molares:

$$f_1 = \frac{r_1 F_1^2 + F_1(1 - F_1)}{r_1 F_1^2 + 2F_1(1 - F_1) + r_2(1 - F_1)^2} \quad (7)$$

donde f_i =fracción molar instantánea de i en el copolímero siendo $i=1, 2$ ($f_1+f_2=1$), F_i = fracción molar instantánea de i en la alimentación ($F_1+F_2=1$) y r_1 y r_2 = relaciones de reactividad de los monómeros 1 y 2 respectivamente.

Para un determinado medio de reacción con una mezcla de monómeros dada (F_1), la ecuación describe – conocidos r_1 y r_2 –, cómo es el copolímero que se forma en ese instante a nivel composicional (f_1). La ecuación

Capítulo 2

diferencial 6 se puede integrar obteniéndose una ecuación que ya es capaz de dar información de la evolución de la reacción en función del tiempo o de la conversión:

$$\frac{[M_2]}{[M_2]_0} = \left(\frac{[M_2]_0 [M_1]}{[M_1]_0 [M_2]} \right)^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left(\frac{(r_1 - 1) \left(\frac{[M_1]}{[M_2]} \right) - r_2 + 1}{(r_1 - 1) \left(\frac{[M_1]_0}{[M_2]_0} \right) - r_2 + 1} \right)^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}} \quad (8)$$

donde $[M]_0$ es la concentración del monómero i (siendo $i=1,2$) a tiempo 0.

Esta ecuación puede dar una descripción en función del tiempo y ofrece también datos composicionales promedio del *acumulado* de copolímero, es decir, del conjunto de cadenas formadas hasta una determinada conversión. El concepto de fracción molar acumulada (fcm) será empleado a lo largo de la tesis (capítulos 5 y 6) para describir la composición promedio de diferentes conjuntos de cadenas.

El software Copol (desarrollado por el Dr. Alberto Gallardo)¹², que es el que se ha usado a lo largo de este trabajo para describir las reacciones de copolimerización – conocidas r_1 y r_2 - utiliza esta ecuación integrada para llevar a cabo la predicción de la composición en función de la conversión.

En este capítulo se ha llevado a cabo un análisis teórico (usando Copol) de diferentes copolimerizaciones de VP para las cuales se conoce o se han calculado las relaciones de reactividad. El objetivo ha sido evaluar de forma comparativa la relevancia de la homología del grupo polimerizable en las características composicionales del material copolimérico final. Esta discusión se ha trasladado al caso de redes y a las características en densidad de entrecruzamiento.

2-Experimental:

2.1. Reactivos

La vinilpirrolidona (VP), de Aldrich, se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C. El azobisisobutironitrilo (AIBN, Aldrich) se recrystalizó en etanol. La sulfopropilvinilpirrolidona (V_S) se sintetizó como se describe en el capítulo uno. El resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

2.2. Reacciones de copolimerización a baja conversión

La polimerización se llevó a cabo disolviendo en agua la VP y la V_S en una concentración total de monómero de 1M con AIBN como iniciador, en concentración 1.5×10^{-2} M. Se burbujeó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se introdujo en la estufa a 60°C durante 2 horas. Los copolímeros obtenidos se purificaron por diálisis en agua durante 48 horas con membranas de cut-off 3500 y posteriormente se aislaron por liofilización. El tiempo de reacción se ajustó para obtener conversiones menores al 5% en peso para satisfacer la ecuación de copolimerización (Ecuación 4, ecuación de Mayo).

2.3. Cálculo de las relaciones de reactividad

Asumiendo que la copolimerización está gobernada por el modelo terminal se determinaron las relaciones de reactividad de las copolimerizaciones de Vs y VP en agua. La determinación de r_1 y r_2 a partir de los datos composicionales en alimentación y en el copolímero, que corresponden a reacciones a baja conversión para aproximar la ecuación diferencial de composición-Tabla 1, ha sido llevada a cabo usando el software Copol. Este software lleva a cabo un ajuste no lineal de mínimos cuadrados para encontrar los mejores r_1 y r_2 de acuerdo a las ecuaciones generales de copolimerización aplicando el tratamiento no-lineal de mínimos cuadrados propuesto por Tidwell y Mortimer¹³.

Se obtuvieron unas relaciones de reactividad de $r_{VP}=1.61$ y $r_{Vs}=0.90$.

Tabla 1: Fracciones molares en la alimentación (F_{Vs}) y en el copolímero (f_{Vs}) de Vs, para reacciones de copolimerización estadística a baja conversión.

F_{Vs}	f_{Vs}
0.2	0.16
0.4	0.33
0.6	0.49
0.8	0.79

Las fracciones molares de monómero en el copolímero se determinaron a partir de los espectros de ^1H -RMN de los copolímeros preparados a baja conversión con diferente alimentación. Se utilizaron las señales con desplazamiento químico de 2.60-2.95 ppm ($2H_{Vs}$); 2.95-3.80 ppm ($N\text{-CH}_2$ Vs y VP, CH -cadena en Vs y VP), utilizando las ecuaciones 9-11.

$$A_{2.95-3.80} = 3H_{Vs} + 3H_{VP} \quad (9)$$

$$A_{2.60-2.95} = 2H_{Vs} \quad (10)$$

$$f_{Vs} = \frac{H_{Vs}}{H_{Vs} + H_{VP}} \quad (11)$$

siendo A el área de la integral de la correspondiente región obtenida con el programa MestreNova® 6.

En la descripción de las reacciones de copolimerización en función de la conversión –conocidas r_1 y r_2 - Copol utiliza la ecuación integrada (8).

Capítulo 2

2.4. Equipos

Los espectros de ^1H -RMN se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 en D_2O con TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala δ relativos a TMS. La composición se determinó por la intensidad de las integrales de las unidades de protón, como se ha descrito anteriormente.

3-Resultados y discusión:

3.1. Funcionalización de cadenas lineales derivadas de VP

3.1.1. Funcionalización de PVP con grupos sulfonato (como ejemplo) mediante copolimerización de VP con otros monómeros portadores de dicho grupo

Para conseguir PVP funcionalizada con grupos sulfónicos, como ejemplo, se podría copolimerizar VP con un monómero comercial sulfonado como el metacrilato de sulfopropilo (M_S , ver Figura 5).

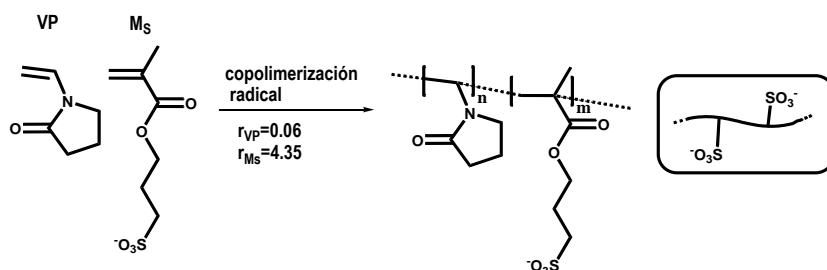


Figura 5: Esquema de la posible funcionalización de PVP por copolimerización con metacrílicos

En el ya mencionado esquema Q,e de Alfrey y Price¹⁴ donde Q es un parámetro directamente relacionado con la reactividad, el valor de Q de la VP y de los metacrílicos es de 0.14 y alrededor de 1 respectivamente¹⁵. El valor de Q de referencia es el del estireno que es 1. En otras palabras, y tal y como se ha mencionado en la introducción de la tesis, VP es un monómero poco activado en copolimerización con metacrílicos, debido a su mucho menor capacidad de estabilización del radical por resonancia. Así, en el Polymer Handbook (pp II/241)¹⁵ o en literatura¹⁶⁻¹⁷, se reportan valores de relaciones de reactividad de VP con diferentes metacrílicos en los intervalos aproximados siguientes: r_{VP} en torno a 0.1 y r_{met} entre 1 y 10. Por tanto, los macrorradicales en crecimiento, especialmente los acabados en VP, son más reactivos hacia metacrílico. Un caso particular es el de la copolimerización de VP con derivados tipo-acrílico no homopolimerizables como los 1,2 disustituidos, derivados de maléico o fumárico. En este caso, como también se ha mencionado anteriormente, hay una tendencia muy alta hacia la alternancia porque cada macrorradical prefiere reaccionar con el monómero heterólogo. Como ejemplo, las relaciones de reactividad de VP y fumarato de dioctilo son 0.02 y 0.04¹⁵.

Para el análisis de la reacción entre VP y M_S se han tomado los valores de $r_{\text{VP}}=0.06$ y $r_{\text{MS}}=4.35$ como referencia de valores de reactividad de VP frente a metacrílicos de estudios anteriores¹⁷. Usando dichas relaciones de reactividad, el software Copol describe composicionalmente la copolimerización en un recipiente cerrado en función de la conversión para tres reacciones tomadas como ejemplo (Figura 6). Hay una dramática heterogeneidad composicional que se relaciona con la diferencia de reactividad. Puesto que los metacrílicos son

mucho más reactivos, la reacción comienza formando cadenas mucho más ricas en metacrilato que el valor nominal de la composición inicial en la alimentación. Cuando los metacrilatos empiezan a consumirse se forman cadenas ricas en VP. Este fenómeno es especialmente relevante a bajas composiciones en metacrilato (indicado en el ejemplo $F_{VP}=0.75$), donde el copolímero resultante debería ser muy parecido a la PVP original. Sin embargo, a esta composición vemos como se forma un gradiente continuo desde $f_{VP} = 0.3$ hasta 1 a conversiones menores de 0.6. Si el objetivo es conseguir PVP con una carga controlada y definida de la funcionalidad, estas copolimerizaciones son sencillamente inaceptables. Además, como ya se ha mencionado, se perdería la integridad de la cadena principal al introducir unidades metacrílicas y a altas cantidades de comonómero es cuestionable denominar a estos polímeros derivados de PVP.

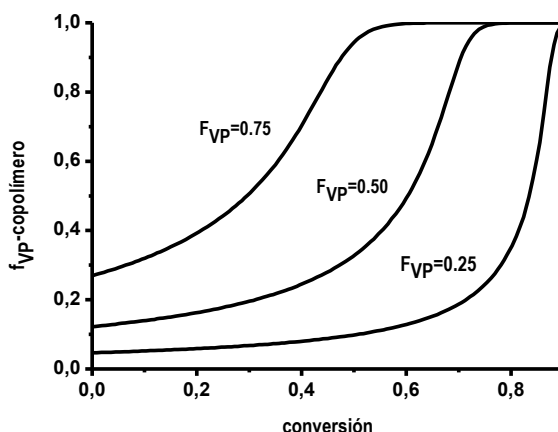


Figura 6: Representación teórica de la fracción molar instantánea de VP en el copolímero en función de la conversión para tres reacciones con fracciones molares en la alimentación de VP de 0.75, 0.50 y 0.25.

En esta tesis se plantea la funcionalización lateral de la PVP desde una aproximación homóloga, es decir, funcionalizar el monómero VP y posteriormente homopolimerizarlo o copolimerizarlo con VP sin modificar. Esta aproximación es posible empleando los monómeros descritos en el capítulo uno. Esta ruta de funcionalización lateral permite no solo mantener el esqueleto principal de la PVP sino copolimerizar monómeros en principio más parecidos en reactividad. La naturaleza de los dobles enlaces polimerizables debe de ser parecida puesto que el entorno del doble enlace no se ve sensiblemente afectado. La funcionalización de PVP con grupos sulfónicos por polimerización de VP con V_s está representada en el esquema de la Figura 7.

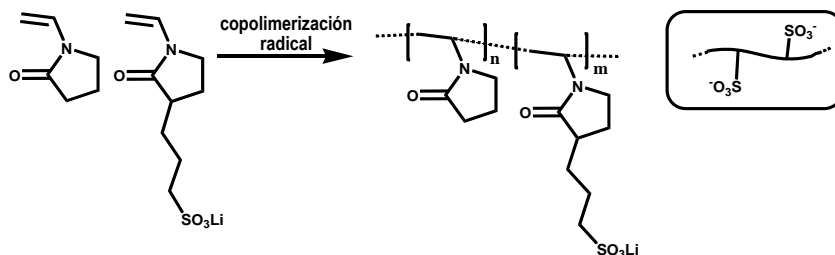


Figura 7: Esquema de la funcionalización de PVP por copolimerización con V_s .

Capítulo 2

Se han calculado las relaciones de reactividad en copolimerización radical de VP y V_s como se ha descrito en el apartado experimental. Los valores de relaciones de reactividad obtenidos han sido $r_{VP} = 1.61$ y $r_{Vs} = 0.90$. Cumpliendo las expectativas, el nuevo monómero V_s sintetizado presenta una reactividad mucho más cercana a la de la VP que en el caso de la copolimerización VP- M_s . El diagrama de composición de la Figura 8 es muy cercano a la diagonal, que es la línea de referencia de nula heterogeneidad composicional en función de la composición.

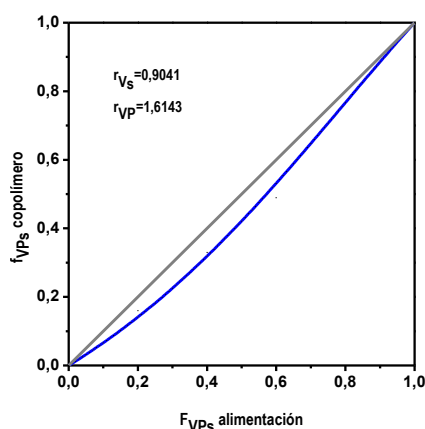


Figura 8: Diagrama de composición en la copolimerización de VP con V_s

En la Figura 9 se muestra como efectivamente los copolímeros obtenidos a alta conversión son mucho más homogéneos que los obtenidos en las reacciones con M_s . A alta conversión se obtiene una composición media similar al valor nominal de la alimentación, incluso en copolímeros en los que se desee introducir bajo nivel de funcionalización. Se obtiene una PVP funcionalizada bien definida y con posibilidad de control de carga.

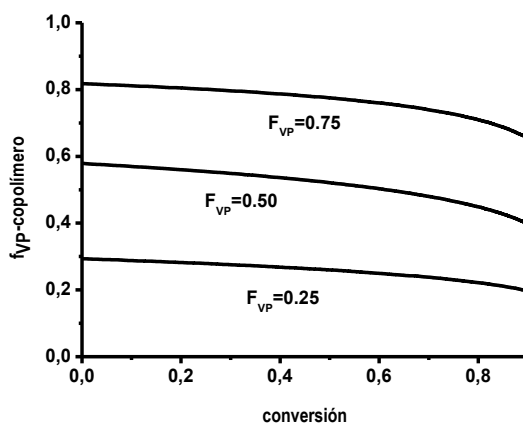


Figura 9: Teórica fracción molar instantánea de VP en la copolimerización en función de la conversión para tres reacciones con fracciones molares iniciales en la alimentación de 0.75, 0.50 y 0.25.

3.1.2 Funcionalización de copolímeros heterogéneos VP-MMA

En el Capítulo 5 se utiliza el sistema copolimérico VP-MMA para preparar micro y nano-esferas funcionalizadas. Se parte de un trabajo anterior¹⁸ en que se describía como la copolimerización de VP y MMA en metanol rendía a temperatura ambiente un sistema de dos fases, una fase dispersa rica en MMA y otra continua rica en VP. Este comportamiento está directamente relacionado con la mencionada heterogeneidad composicional (ver Figura 10) y la formación de dos especies mayoritarias que se separan en fases ya que la especie rica en MMA tiene una UCST en metanol a temperatura por encima de ambiente.

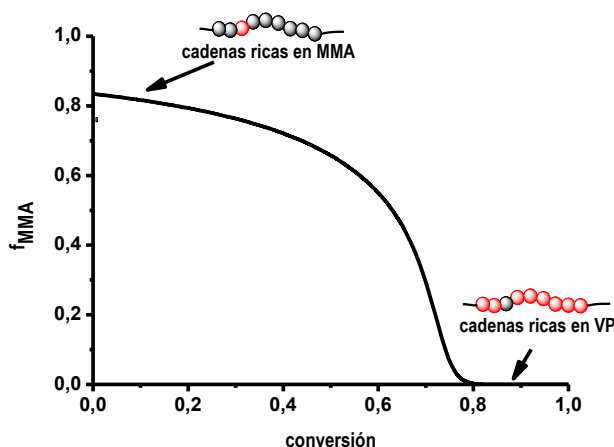


Figura 10. Variación con la conversión de la fracción molar de MMA instantánea en el copolímero en la copolimerización de VP y MMA. Calculado usando el software Copol empleando relaciones de reactividad de la literatura, $r_{MMA}=4.35$ y $r_{VP}=0.06$ ¹⁷.

En dicho capítulo 5 se aborda la funcionalización de esta colección heterogénea de cadenas. Usando de nuevo el grupo sulfonato como ejemplo, se parte de la siguiente hipótesis: el uso de M_S o de V_S como tercer comonomero (en pequeña cantidad) en la copolimerización de VP y MMA funcionalizaría selectivamente cada uno de los dos tipos de especies principales de acuerdo a la homología de los monómeros funcionalizados a los componentes principales de cada fase. En el capítulo 5 se usan ambos comonomeros y se profundiza en este estudio.

3.2. Redes. Homología del entrecruzante

3.2.1 Redes de VP

La discusión anterior se puede enfocar en el entrecruzante como comonomero y por tanto extender a la formación de redes de VP. En este caso la heterogeneidad composicional entre la VP y el entrecruzante implica una heterogeneidad estructural en densidad de entrecruzamiento, el cual es un parámetro crítico¹⁹. Uno de los entrecruzantes comerciales más empleados es el etilenglicoldimetacrilato (EGDMA, MM). La copolimerización de VP con MM (Figura 11) con fracciones molares iniciales en alimentación de entrecruzante de 0.5, 2.5 y 5 % molar, da como resultado las reacciones descritas en la Figura 12 (utilizando las mismas relaciones de reactividad usadas en VP/ M_S , $r_{VP}=0.06$ y $r_M=4.35$).

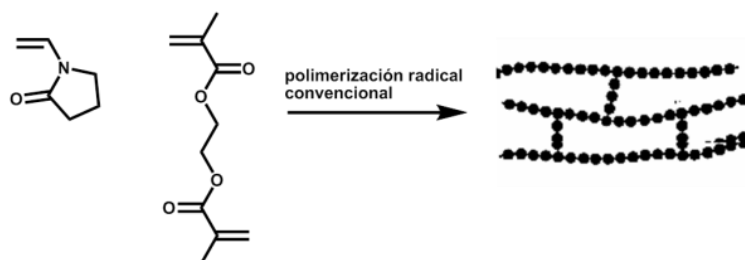


Figura 11: Esquema de la preparación de redes de VP mediante el uso de entrecruzante comercial MM en la polimerización.

Puesto que el entrecruzante comúnmente se utiliza en baja cantidad, estas reacciones entran dentro de las más problemáticas de acuerdo con la discusión previa, el intervalo de baja funcionalidad. Se obtiene un gradiente composicional durante las primeras etapas de la reacción hasta que prácticamente se consume todo el metacrilato, siendo su extensión dependiente de las condiciones iniciales en alimentación. Como ya se ha mencionado esta heterogeneidad composicional se relaciona con la inhomogeneidad estructural en la densidad de entrecruzamiento. Hasta una cierta conversión se obtiene un gradiente de entrecruzamiento y tras consumirse el entrecruzante las nuevas cadenas no entrecruzan y se forman redes de baja calidad. En la práctica, PVP entrecruzada no se suele preparar por polimerización en presencia de entrecruzantes sino por entrecruzamiento de cadenas lineales de PVP preformadas por diferentes métodos como la radiación por ionización²⁰.

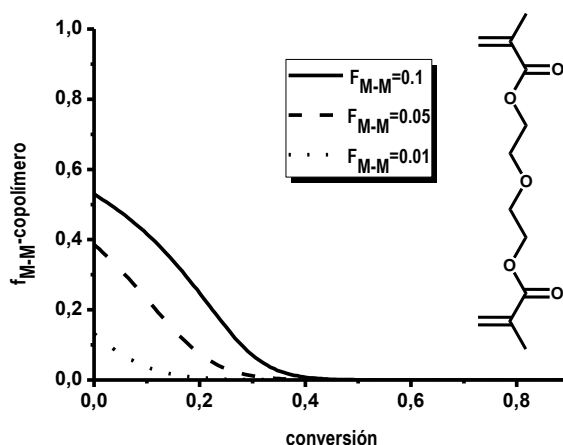


Figura 12: Fracción molar instantánea teórica de los metacrilatos de EGDMA (MM) en la copolimerización en función de la conversión para tres reacciones con fracciones molares iniciales en alimentación de entrecruzante de 0.05, 0.025 y 0.005.

Para solventar el inconveniente asociado a la heterogeneidad en la densidad de entrecruzamiento, se pueden usar entrecruzantes homólogos derivados de VP, como algunos descritos en la literatura²¹ o el VV descrito en el capítulo 1 que ha sido sintetizado por primera vez en este trabajo de tesis. En la Figura 13 se muestra la predicción de reacciones con el entrecruzante homólogo VV, utilizando como aproximación las

relaciones de reactividad de VP y Vs y las mismas fracciones molares que en el ejemplo anterior con MM. Las redes obtenidas con este entrecruzante son mucho más homogéneas.

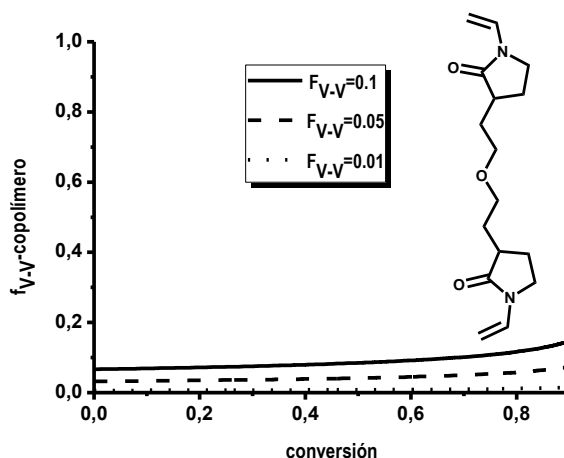


Figura 13: Fracción molar instantánea teórica de VV en la copolimerización en función de la conversión para tres reacciones con fracciones molares iniciales en alimentación de entrecruzante de 0.05, 0.025 y 0.005.

La funcionalización de estas redes podría llevarse a cabo por la misma aproximación homóloga, copolimerizando VP con VP funcionalizada y entrecruzando al mismo tiempo con VV como se muestra en el esquema de la Figura 14.

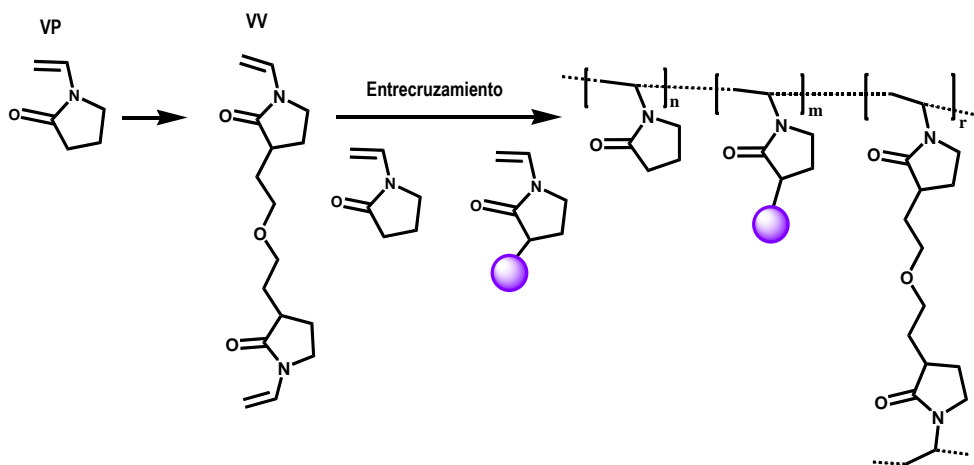


Figura 14: Esquema de la ruta de síntesis de redes de VP funcionalizadas

La metodología para formar las redes es sencilla y se pueden obtener redes con control de la densidad de entrecruzamiento y con control de la funcionalidad introducida.

Capítulo 2

3.2.2 Redes de dos componentes VP-metacrilatos

La formación de redes en sistemas de dos componentes con alta reactividad diferencial como VP y metacrilatos es un objetivo en sí mismo pues es difícil entrecruzar de forma efectiva una colección tan heterogénea de cadenas. Así, se puede deducir de forma 'intuitiva' que el entrecruzante comercial etilenglicol dimetacrilato (MM) con dobles enlaces homólogos a los metacrilatos, entrecruzarán preferentemente cadenas homólogas ricas en metacrilato y el uso del entrecruzante de síntesis VV mencionado antes entrecruzarán preferentemente cadenas ricas en VP.

En cambio, como se ha descrito de forma teórica en la literatura²², se pueden obtener entrecruzamientos efectivos en este tipo de redes usando dos aproximaciones: el empleo de mezcla de entrecruzantes homólogos (MM+VV) ó el uso de un entrecruzante asimétrico bihomólogo (MV, descrito en el capítulo uno) a cada una de las dos especies. La primera estrategia conduciría a topologías con tendencias a las llamadas redes interpenetradas (IPNs), mientras que la segunda daría lugar a topologías con tendencia a co-redes en las que las cadenas ricas en el monómero más reactivo (metacrilatos) se unirían a las cadenas ricas al monómero menos reactivo (VP). Se ha descrito que redes de dos componentes de acrilamida y metacrilato de 2-hidroxietilo entrecruzadas con un compuesto homólogo hacia ambos, presentan propiedades mecánicas superiores a redes preparadas con otros entrecruzantes²³.

En el Capítulo 6 se han preparado redes de este tipo con diferentes tipos de entrecruzamiento, y se ha analizado la influencia de la homología del o de los entrecruzantes en las propiedades de las redes. En este capítulo además se funcionalizan las redes con V_s para estudiar su conductividad en forma de hidrogel. De nuevo, la incorporación de la funcionalidad en las cadenas hidrófilas es posible gracias al nuevo monómero V_s homólogo a VP sintetizado en este trabajo.

4-Conclusiones:

Las nuevas VPs funcionalizadas permiten la copolimerización homogénea con VP para obtener, via polimerización radical convencional, auténtica PVP funcionalizada dada la homogeneidad de los grupos polimerizables. De igual manera, la homología de los grupos polimerizables del nuevo entrecruzante simétrico VV con la VP permite obtener redes de PVP con homogeneidad en la densidad de entrecruzamiento.

La alta heterogeneidad en copolimerización de VP con metacrilatos (monómeros muy activados) hace que en una única reacción se formen principalmente dos tipos de especies ricas en cada uno de los comonómeros. Esta característica puede ser aprovechada como una oportunidad en la preparación de nuevos materiales de estos dos componentes.

5-Bibliografía:

- 1 Matyjaszewski, K., Davis, T. P. & Wiley, J. *Handbook of radical polymerization*. (Wiley Online Library, 2002).
- 2 Odian, G. Chain Copolymerization. *John Wiley & Sons, Inc*, 464-543 (2004).
- 3 Stevens, M. P. *Polymer chemistry:: An Introduction*. 3rd Edition edn, (Oxford University Press New York, NY, 1999).
- 4 Munk, P. T. & Aminabhavi, M. *Introduction to macromolecular science*. 2nd Edition edn, (Wiley-Interscience, 2002).
- 5 Elias, H. G. & Soucek, M. *An introduction to polymer science*. (VCH Weinheim, 1997).
- 6 J. Areizaga, M. M. C., J. M. Elorza, J. J. Iruín. *Polímeros*. 1ª Edición edn, (2002).
- 7 Penczek, S. Terminology of kinetics, thermodynamics, and mechanisms of polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **40**, 1665-1676 (2002).
- 8 Fukuda, T., Ma, Y. D. & Inagaki, H. Free-radical copolymerization. 3. Determination of rate constants of propagation and termination for styrene/methyl methacrylate system. A critical test of terminal-model kinetics. *Macromolecules* **18**, 17-26 (1985).
- 9 Mayo, F. R. & Lewis, F. M. Copolymerization. I. A basis for comparing the behavior of monomers in copolymerization; the copolymerization of styrene and methyl methacrylate. *Journal of the American Chemical Society* **66**, 1594-1601 (1944).
- 10 E. Jenkel, Z. *Journal of physical and Chemical abstracts A*, 24 (1942).
- 11 Alfrey Jr, T. & Goldfinger, G. The mechanism of copolymerization. *The Journal of Chemical Physics* **12**, 205 (1944).
- 12 Copol®, R. N., May 2004. Part of the program can be found at: Gallardo, A.; Aguilar, M.R.; Abraham, G.; San Román, J. J. *Chem. Edu.*, 1210-1215 (2004).
- 13 Tidwell, P. W. & Mortimer, G. A. An improved method of calculating copolymerization reactivity ratios. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers* **3**, 369-387 (1965).
- 14 Alfrey, T. & Price, C. C. Relative reactivities in vinyl copolymerization. *Journal of Polymer Science* **2**, 101-106 (1947).
- 15 Brandrup, J. I., E.H. (2003).
- 16 Bork, J. F. & Coleman, L. Nitrogen-containing monomers. II. Reactivity ratios of n-vinyloxazolidone and N-vinylpyrrolidone with vinyl monomers. *Journal of Polymer Science* **43**, 413-421 (1960).
- 17 Reddy, B., Arshady, R. & George, M. Copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone with 2, 4, 5-trichlorophenyl acrylate and with 2-hydroxyethyl methacrylate: Reactivity ratios and molecular weights. *European Polymer Journal* **21**, 511-515 (1985).

Capítulo 2

- 18 Aranaz, I., Reinecke, H., Elvira, C. & Gallardo, A. Compositionally-tunable surface nanostructuration of microspheres obtained from a self-stabilizing copolymerization of methylmethacrylate and vinylpyrrolidone. *Polymer* **52**, 2991-2997 (2011).
- 19 Fernández, E., López, D., López-Cabarcos, E. & Mijangos, C. Viscoelastic and swelling properties of glucose oxidase loaded polyacrylamide hydrogels and the evaluation of their properties as glucose sensors. *Polymer* **46**, 2211-2217 (2005).
- 20 An, J. C. Synthesis of the combined inter-and intra-crosslinked nanohydrogels by e-beam ionizing radiation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **16**, 657-661 (2010).
- 21 White, L., Jönson, S., Hoyle, C. & Mathias, L. Synthesis of 3-alkylated-1-vinyl-2-pyrrolidones and preliminary kinetic studies of their photopolymerizations. *Polymer* **40**, 6597-6605 (1999).
- 22 Reinecke, H. & Gallardo, A. Symmetric Versus Asymmetric “Homologous” Vinylic Cross-Linkers in Two-Components Networks: Formation of Pseudo-Conetworks or Pseudo-IPNs. *Macromolecular Theory and Simulations* **18**, 25-29 (2009).
- 23 Demirgöz, D., Navarro, R., Pérez, M., Reinecke, H. & Gallardo, A. Asymmetric bihomologous crosslinkers for bicomponent gels—The way to strongly increased elastic moduli. *Journal of Applied Polymer Science* **115**, 896-900 (2009).

Capítulo 3

PVP sulfonada y biocompatible con propiedades antiangiogénicas

1-Introducción:

Las nuevas VPs modificadas permiten, como se ha descrito en el capítulo dos, obtener auténtica PVP funcionalizada. En este trabajo, se aprovecha esta química para obtener por primera vez copolímeros lineales y redes de auténtica PVP sulfonada (Figura 1) a partir del monómero V_s y el entrecruzante VV descritos anteriormente. En este capítulo se han sintetizado copolímeros lineales y redes con distinta cantidad de V_s y/o VV y se ha evaluado su citotoxicidad comparada con PVP como control citocompatible. Como se ha demostrado la reactividad en agua en polimerización radical convencional de VP y V_s es semejante y por lo tanto se pueden sintetizar copolímeros homogéneos.

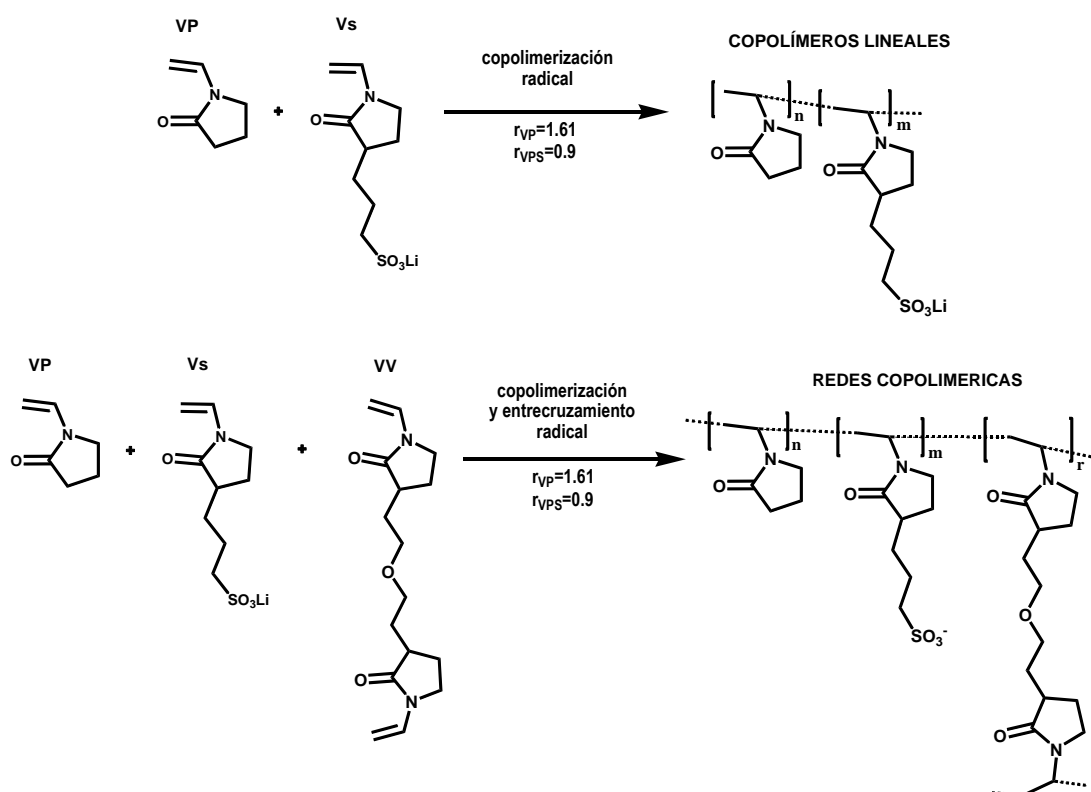


Figura 1: Estructuras de PVP sulfonada lineal y en forma de red a partir de VP, el monómero V_s y el entrecruzante VV

El grupo sulfonato es un grupo con amplio potencial en el campo de los biomateriales y en concreto en aplicaciones como la antiangiogénesis¹. La antiangiogénesis es un proceso natural regulado estrictamente por pro- y anti- señales angiogénicas que controlan la formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis por definición es la formación de vasos sanguíneos. Existen diversas enfermedades relacionadas con variaciones anómalas de estas señales, como el crecimiento masivo de tumores sólidos. Los tumores segregan factores de crecimiento para activar la formación de vasos sanguíneos que les permitan alimentarse y crecer como se muestra en el esquema de la Figura 2. Para controlar el proceso antiangiogénico que favorece el crecimiento tumoral la comunidad científica ha realizado diversos intentos de regulación del proceso con compuestos prometedores en el mercado (e.g. Avastin®, Nexavar®, Sutent®, Votrient®)².

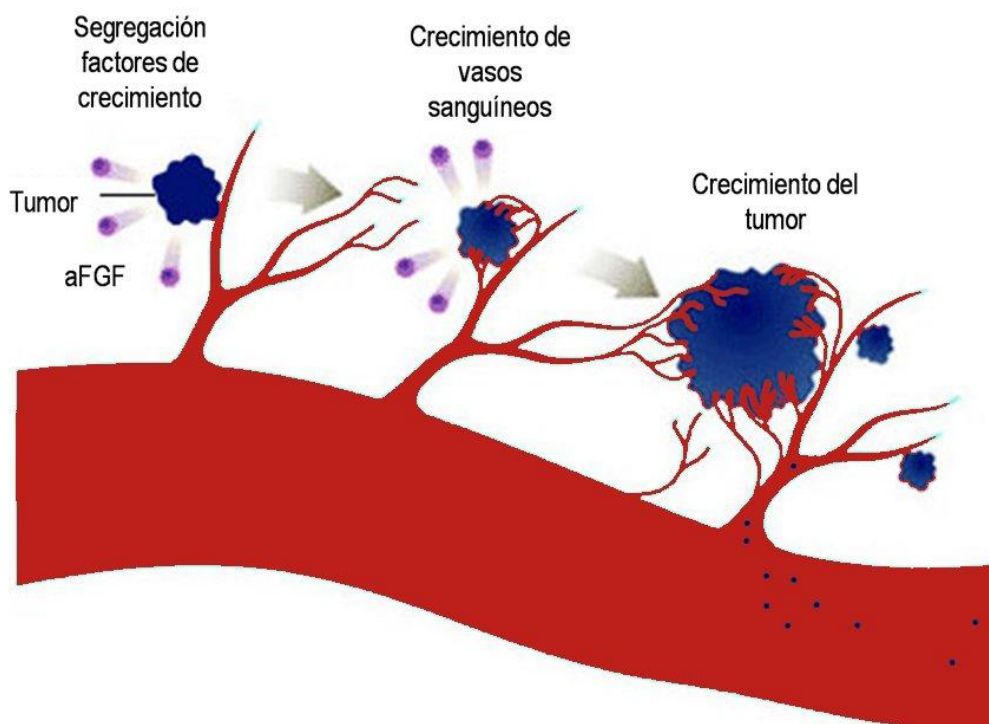


Figura 2: Esquema del proceso de angiogénesis que alimenta los tumores sólidos.
(<http://www.engineerdir.com/press/catalog/803/index.html>)

Estos procesos angiogénicos alterados se relacionan comúnmente con la regulación anormal de diferentes factores de crecimiento dependientes de la heparina (polisacárido con gran significancia biológica) como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)³. Los FGFs son una familia de polipéptidos que juegan un papel muy importante en la proliferación, migración y diferenciación de las células vasculares. Los FGFs son proteínas dependientes de la heparina y requieren de la interacción con proteoglicano heparan sulfonato (HSPG) para activar sus receptores transmembrana (FGFR) y por lo tanto activar el proceso angiogénico⁴. Es decir, los FGFs segregados por los tumores sólidos han de interaccionar con los grupos sulfonatos de la heparina (ver estructura en la Figura 3) para activar la formación de vasos sanguíneos que les alimentan.

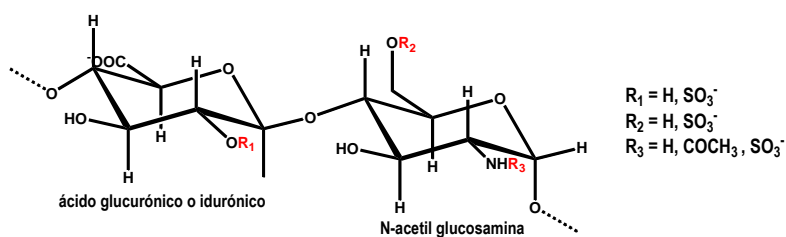


Figura 3: Estructura química de la heparina. Densidad media por unidad de azúcar de grupos sulfonatos 2,7⁵.

La modulación de la actividad de los factores de crecimiento es una interesante aproximación para abordar la antiangiogénesis y el crecimiento de los tumores. Se han sugerido diversas estrategias para la inhibición de los FGF⁶⁻⁷, siendo una de las más efectivas la administración de moléculas miméticas de la heparina^{1,8-10} que interaccionen con los factores de crecimiento de manera competitiva dificultando su anclaje a los receptores tirosina quinasa de la membrana celular (responsables de la respuesta biológica de la célula). Puesto que el anclaje entre los FGFs y la heparina se produce a través de los grupos sulfonatos presentes en ella el mimético debe presentar grupos sulfonatos en su estructura para poder competir. Se han descrito polímeros miméticos de la heparina que incorporan en su estructura unidades sulfonadas, como el ácido 5-amino-2-naftalensulfónico (ANSA) o el ácido 2-acrilamido-2-propanometil sulfónico (AMPS), con resultados positivos en la inhibición de la actividad de los factores de crecimiento dependientes de la heparina^{1,6,11}.

Estudios anteriores sugieren que la mera presencia de grupos sulfonatos puede no ser suficiente para la inhibición de los factores de crecimiento sino que parece ser necesaria también una microestructura y conformación parecida a la heparina. En el caso de los copolímeros con AMPS, se requieren al menos dos grupos sulfonatos adyacentes para proporcionar actividad biológica. Para los copolímeros con ANSA una apropiada organización supramolecular de la cadena macromolecular favorece su actividad antiangiogénica. Estudios recientes demuestran como la actividad de los sistemas poliméricos está relacionada con su conformación macromolecular en condiciones fisiológicas¹²⁻¹³. Por lo tanto, de acuerdo con estos estudios, tanto la presencia de grupos sulfonatos como su apropiada distribución a lo largo de la cadena macromolecular parecen críticos en la actividad biológica de este tipo de miméticos de heparina.

La auténtica PVP sulfonada lineal podría ser un mimético de la heparina y por lo tanto un competidor con efecto antiangiogénico. Además, las conocidas propiedades de biocompatibilidad y solubilidad en agua de la PVP hacen que estos copolímeros sean muy atractivos para esta aplicación.

La preparación de PVP sulfonada se ha llevado a cabo mediante simple polimerización radical en agua. Como se ha comentado en el capítulo 2, el uso de comonómeros homólogos VP y V_s permite obtener copolímeros composicionalmente homogéneos y con un sencillo control de carga (mediante ajuste composicional en alimentación). Este control de carga permite ajustar el número de grupos sulfonato introducidos y por lo tanto la influencia de la cantidad de SO₃⁻ en las propiedades antiangiogénicas del polímero. Estos copolímeros tienen una distribución estadística de unidades, con presencia de todo tipo de secuencias (VP-VP, VP-V_s ó V_s-V_s, en términos de diadas). Dada la similar reactividad de los dos monómeros, el peso de los diferentes tipos de secuencias dependerá principalmente de la composición en alimentación. Además, la química de VP discutida en el capítulo 2 ofrece la posibilidad de preparar sistemas alternantes¹⁴⁻¹⁶, con microestructura controlada, a partir de la copolimerización de V_s con derivados vinílicos 1, 2 disustituidos (derivados de maleico o fumárico). La copolimerización de V_s con maleato de metilo (MALME, el derivado vinílico 1,2 disustituido elegido en este trabajo) tiene una gran tendencia hacia la alternancia ya que los macrorradicales acabados en V_s son mucho más reactivos hacia MALME (debido a la mencionada baja reactividad diferencial de los derivados de vinilpirrolidona) mientras que los macrorradicales acabados en MALME solo pueden reaccionar con V_s debido al impedimento estérico del monómero homólogo. Dada la importancia de la microestructura, y los resultados previos que indicaban la necesidad de unidades sulfonadas adyacentes para que los sistemas fuesen activos

Capítulo 3

como competidores de heparina, estas estructuras alternantes van a ser usadas en este trabajo como sistemas de control negativo en las que no existen unidades V_S - V_S adyacentes.

2- Experimental:

2.1. Reactivos:

La vinilpirrolidona (VP), de Aldrich, se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C. El azobisisobutironitrilo (AIBN, Aldrich) se recrystalizó en etanol. La V_S y el entrecruzante homólogo VV se sintetizaron como se describe en el capítulo uno. El maleato de metilo (MALME), de Aldrich, así como el resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

2.2. Polimerizaciones:

Copolímeros lineales estadísticos:

La polimerización se llevó a cabo disolviendo en agua la VP y la V_S en una concentración total de monómero de 1M con AIBN como iniciador, en concentración 1.5×10^{-2} M. Se burbujó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se introdujo en la estufa a 60°C durante 24 horas. Los polímeros obtenidos se denominaron de la siguiente manera: PV_S es el homopolímero de V_S y PV_{S-x} corresponde a los copolímeros poli(VP-*stat*- V_S) donde x representa la fracción molar en alimentación de V_S . Los copolímeros obtenidos se aislaron y purificaron por diálisis en agua durante 48 horas con membranas de cut-off 3500 y posteriormente se aislaron por liofilización.

El análisis de la composición de los copolímeros se realizó por comparación de las integrales de las señales de resonancia de protón de los espectros mostrados en la Figura 4. Se utilizaron las señales con desplazamiento químico de 2.60-2.95 ppm ($2H_{V_S}$); 2.95-3.80 ppm ($N-CH_2$ V_S y VP, CH-cadena en V_S y VP). Las correspondientes fracciones molares en el copolímero se calcularon utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3:

$$A_{2.95-3.80} = 3H_{V_S} + 3H_{VP} \quad (1)$$

$$A_{2.60-2.95} = 2H_{V_S} \quad (2)$$

$$f_{V_S} = \frac{H_{V_S}}{H_{V_S} + H_{VP}} \quad (3)$$

siendo A el área de la integral de la correspondiente región obtenida con el programa MestreNova® 6.

Copolímeros alternantes:

Se disolvieron en N,N'-dimetilformamida (DMF) el maleato de metilo (MALME) y la VP o la V_S y el iniciador (AIBN) a una concentración total de 1M y $1,5 \times 10^{-2}$ M respectivamente. Se desplazó el oxígeno presente en la disolución burbujando una corriente de nitrógeno durante 30 minutos y se dejó reaccionar durante 24 horas a 60°C. Tras la polimerización los copolímeros se aislaron precipitándolos en acetona y redisolviéndolos en agua.

Se purificaron mediante diálisis en agua en membranas de cut-off de 3500 durante 48 horas y posteriormente se liofilizaron.

El análisis de la composición de los copolímeros se realizó por comparación de las integrales de las señales de resonancia de protón de los espectros mostrados en la Figura 6. Se utilizaron las señales con desplazamiento químico a 1.0-2.6 ppm ($6H_{VP}$ o $9H_{Vs}$); 3.61ppm ($8H_{MALME}$). Las correspondientes fracciones molares en el copolímero se calcularon utilizando las ecuaciones 4, 5 y 6:

$$A_{3.61} = 8 H_{MALME} \quad (4)$$

$$A_{1.0-2.6} = 6 H_{VP} \text{ o } 9 H_{Vs} \quad (5)$$

$$f_{Vs} = \frac{H_{Vs}}{H_{Vs} + H_{MALME}} \quad (6)$$

siendo A el área de la integral de la correspondiente región obtenida con el programa MestreNova® 6.

Los copolímeros alternantes con ácido maléico (MA) fueron obtenidos por hidrólisis en disolución de NaOH 1M a partir de los correspondientes copolímeros con maleato de metilo.

Para confirmar la estructura de los copolímeros alternantes se monitorizó la reacción de copolimerización entre Vs y MALME en por RMN ARRAY dinámico. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian 400. Para la cuantificación de los experimentos se siguieron las condiciones descritas en trabajos anteriores¹⁷: se aplicó una secuencia de pulsos de $7\mu s$ equivalente a un ángulo de 90° y 120 segundos de tiempo de retardo para asegurar que se permite la relajación total de los protones y poder procesar los datos individuales. La velocidad de giro de las muestras fue de 7 Hz y por cada dato se realizó una única adquisición (FID), $n_t=1$, para asegurar que la medida corresponde a la composición/conversión instantánea y no a una media. La muestra se mantuvo a $55^\circ C$ utilizando el controlador de temperatura del equipo de resonancia. Como referencia se utilizó una disolución de DMF en d_6 -DMSO en un capilar fino que se introdujo en el tubo de resonancia.

Redes:

Las redes se prepararon por fotopolimerización radical convencional en masa con Ciba-Geigy Irgacure 369 como iniciador y usando el entrecruzante VV descrito en el capítulo uno. Se mezclaron la VP, el porcentaje deseado de Vs (5,10 o 20% molar), el entrecruzante VV (5 o 10% molar frente al total de monómero) y el iniciador (0,5% en peso). Se añadió la mínima cantidad de agua ($15\mu L$ como máximo) cuando fue necesario para solubilizar Vs. Se burbujeó nitrógeno en la disolución durante 20 min. La disolución se colocó en un soporte de polipropileno cubriéndolo con otro del mismo material para evitar el contacto con el aire durante la polimerización. Se inició la polimerización por irradiación de luz UV a 365nm durante 10min con una lámpara Mercury Lamp Osram HQL (250w). Posteriormente las redes se hincharon y lavaron en agua para eliminar cualquier compuesto sin reaccionar. El análisis de la composición de los copolímeros se realizó por análisis elemental.

Capítulo 3

2.3. Determinación estadística de diadas

Introduciendo las relaciones de reactividad $r_{VP}=1.61$ y $r_{VS}=0.90$, obtenidas como se ha explicado en el capítulo dos, en el programa Copol se calculan las fracciones molares de diadas. El modelo terminal permite describir instantáneamente las fracciones molares de cualquier secuencia utilizando las probabilidades condicionales: Las probabilidades condicionales p_{ii} y p_{ij} para la adición de los monómeros i ó j a una cadena en crecimiento terminada en $\sim M_i$ ($i,j=1,2$), vienen dadas por las relaciones de las velocidades de propagación (Ecuaciones 7 y 8):

$$p_{ii} = \frac{R_{ii}}{R_{ii} + R_{ij}} = \frac{k_{ii}[M_i]}{k_{ii}[M_i] + k_{ij}[M_j]} = \frac{r_i}{r_i + [M_j]/[M_i]} \quad (7)$$

$$p_{ij} = 1 - p_{ii} \quad (8)$$

donde $[M_1]$ y $[M_2]$ son las concentraciones de monómero en la alimentación. Además la fracción molar instantánea de cualquier secuencia es igual a la probabilidad de que exista la primera unidad (f , fracción molar en el copolímero) multiplicada por la correspondiente probabilidad condicional. Por ejemplo, la fracción molar de las diadas basadas en i sería (Ecuaciones 9 y 10):

$$F_{ii} = f_i p_{ii} \quad (9)$$

$$F_{ij+ji} = 2f_i p_{ij} \quad (10)$$

La fracción molar de la secuencia está relacionada con la población de la secuencia y por lo tanto con la microestructura (distribución de secuencias). El programa Copol hace una aproximación a conversión 100% de la fracción molar acumulada utilizando una integración numérica simple de los datos instantáneos.

2.4. Estudios de citotoxicidad in vitro

La citotoxicidad de los copolímeros estadísticos y las redes se estudió utilizando fibroblastos 3T3 de ratón. Los 3T3 se cultivaron en Dulbecco's modificado Eagle's (DMEM) suplementado con 10% de FBS, 1% de antibióticos estreptomycin y penicilina a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron sub-cultivadas cada tres días. Cuando se alcanzó una confluencia del 80-90% las células se consideraron adecuadas para realizar los experimentos. Se sembraron las células por triplicado a una densidad de 2×10^4 cel/mL en una placa de 24 pocillos y se incubaron 24 horas. Posteriormente se reemplazó el medio por medio fresco que contenía el polímero en concentraciones de 0, 1, 10, 100, 1000 µg/mL y se volvieron a incubar 24 horas. Tras ese tiempo se retiró el medio sustituyéndolo por medio fresco y se congelaron y descongelaron las muestras repetidas veces para producir la lisis de la membrana celular de las células que quedasen vivas. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo dsDNA Picogreen para analizar la citotoxicidad de estos nuevos polímeros utilizando PVP como control positivo. En este ensayo se determinó el porcentaje de células vivas por medida de la cantidad de ADN detectada tras la lisis celular.

La cantidad de ADN se midió utilizando el kit dsDNA picogreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, 100µL de cada una de las muestras se añadieron a un placa de 96 pocillos y se preparó una curva de calibrado con los patrones de ADN y el tampón TE/tritonX-100. En cada uno de los pocillos tanto de las muestras como del calibrado se añadieron 100µL del colorante picogreen y

se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tanto las muestras como los patrones se midieron en un lector de placas de fluorescencia (Perkin Elmer Victor 3) a 485/535 nm (excitación/emisión).

La citotoxicidad de las redes se evaluó sembrando células en presencia de ellas en medio completo en una placa de 24 pocillos e incubándolas 48 horas. Posteriormente se observaron las muestras por microscopía óptica y se determinó cualitativamente la cantidad de células vivas.

2.5. Análisis de bioactividad: antiangiogénesis

El efecto de los distintos polímeros con Vs sintetizados en el factor de crecimiento de fibroblastos aFGF, se estudió in vitro según el método descrito por Fernández Tornero et al¹⁸. Brevemente, se sembraron en una placa de 96 pocillos fibroblastos Balb/c 3T3 a una densidad de 9000 cels/mL (1800 cel/pocillo) utilizando como medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero calf y se incubaron durante 6 horas. Se reemplazó el medio por DMEM/Ham'sF-12 (100µL/pocillo) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Tras 14 horas se reemplazó el medio por 10µL de una solución 0.1% BSA en DMEM con el factor de crecimiento aFGF (6.40 ng/mL), 3KDa de heparina (100µg/mL) y el polímero (en concentraciones entre 0 y 1000 µg/mL), y se dejó incubar 72 horas. Para fijar las células se añadieron 10µL de glutaraldehído (25%) y se incubaron durante 10 minutos antes de lavar con agua milli-Q y secar a 37°C. Se colorearon las células fijadas con una disolución de cristal de violeta (1mg/mL) en 50 mM de tampón fosfato a pH 7.2. Se retiró la disolución tras 10 minutos de incubación y se lavaron las células para eliminar el exceso de colorante antes de secarlas a 37°C. Finalmente, se añadió ácido acético al 10%, se mezcló y se midió la absorbancia (620/690 nm) en un lector de microplacas Synergi Multi-Detection de Biotek.

Como control de la citotoxicidad se realizó el ensayo paralelamente sin aFGF en las mismas condiciones.

2.6. Equipos

Los espectros de ¹H-RMN se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 en D₂O o d₆-DMSO con TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala δ relativos a TMS. La composición se determinó por la intensidad de las integrales de las unidades de protón, como se ha descrito anteriormente.

El peso molecular se determinó por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) con un cromatógrafo Shimadzu SIL 20^a-HT con bomba isocrática (serie LC-20D) conectada a un detector diferencial difractométrico (serie RID-10A). Se acondicionaron las tres columnas (PL-aquarel OH 50,40 y 30. Polymer Laboratories) de 8µm a 40°C y se utilizó como eluyente para las muestras (1mg/mL) fase móvil de una solución tampón de 0.2M NaNO₃, 0.01M NaH₂PO₄ a pH 9 a 1mL/min. El calibrado se realizó con patrones monodispersos de polietilenglicol en el rango de 1.0 x 10³ a 500 x 10³ Da obtenidos de Scharlab.

La absorción de agua se determinó por análisis termogravimétrico (TGA) con un equipo TA-Q500 de TA instruments(10°C/min bajo corriente de nitrógeno a 20mL/min).

Las fotopolimerizaciones se realizaron en una lámpara Mercury Lamp Osram HQL (250w). La composición de las redes se determinó por análisis elemental en un analizador rápido Heraeus CHN-O.

3- Resultados y discusión:

3.1. Síntesis y caracterización de Copolímeros lineales

Se han preparado los copolímeros estadísticos poli(VP-*stat*-V_S) mostrados en la Tabla 1 por polimerización radical convencional en agua. Se han sintetizado copolímeros a conversión total con cantidades crecientes de V_S variando la cantidad de V_S en la alimentación siendo la composición final en el copolímero prácticamente igual tal como era de esperar dada la similar reactividad. En la Tabla 1 también se muestran los datos de pesos moleculares promedio en número y su polidispersidad.

Tabla 1: Nomenclatura, composición en V_S, expresada en fracciones molares, en la alimentación y en los copolímeros, peso molecular e índice de polidispersidad.

Copolímero	F _{V_S}	f _{V_S} ^{a)}	Mn (kDa) / PI ^{b)}
PVP	-	-	111 / 3.22
PV_{S-25}	0.25	0.26	65 / 3.06
PV_{S-50}	0.50	0.48	32 / 1.64
PV_{S-75}	0.75	0.75	34 / 1.67
PV_S	1	1	23 / 1.88

a) Obtenido del análisis por RMN, como se describe en la sección experimental

b) Obtenido del análisis por GPC. PI = Polidispersidad

siendo PV_S el homopolímero de V_S y PV_{S-x} los copolímeros entre VP y V_S donde X representa la fracción molar en alimentación de V_S.

Se puede observar que tanto el peso molecular como la polidispersidad de los distintos copolímeros disminuye significativamente al ir aumentando la cantidad de V_S. Esta disminución dependiente de la cantidad de V_S es coherente con una posible transferencia al monómero V_S (para una explicación más detallada, ver la discusión teórica de la transferencia en el capítulo 2).

Para determinar la composición de los copolímeros se han utilizado las ecuaciones descritas en la parte experimental empleando las integrales de los espectros de ¹H-RMN. En la Figura 4 se muestran los espectros de los copolímeros sintetizados donde se puede apreciar claramente el aumento de la intensidad de la señal del CH₂ unido al grupo sulfonato cuanto más rico en V_S es el copolímero.

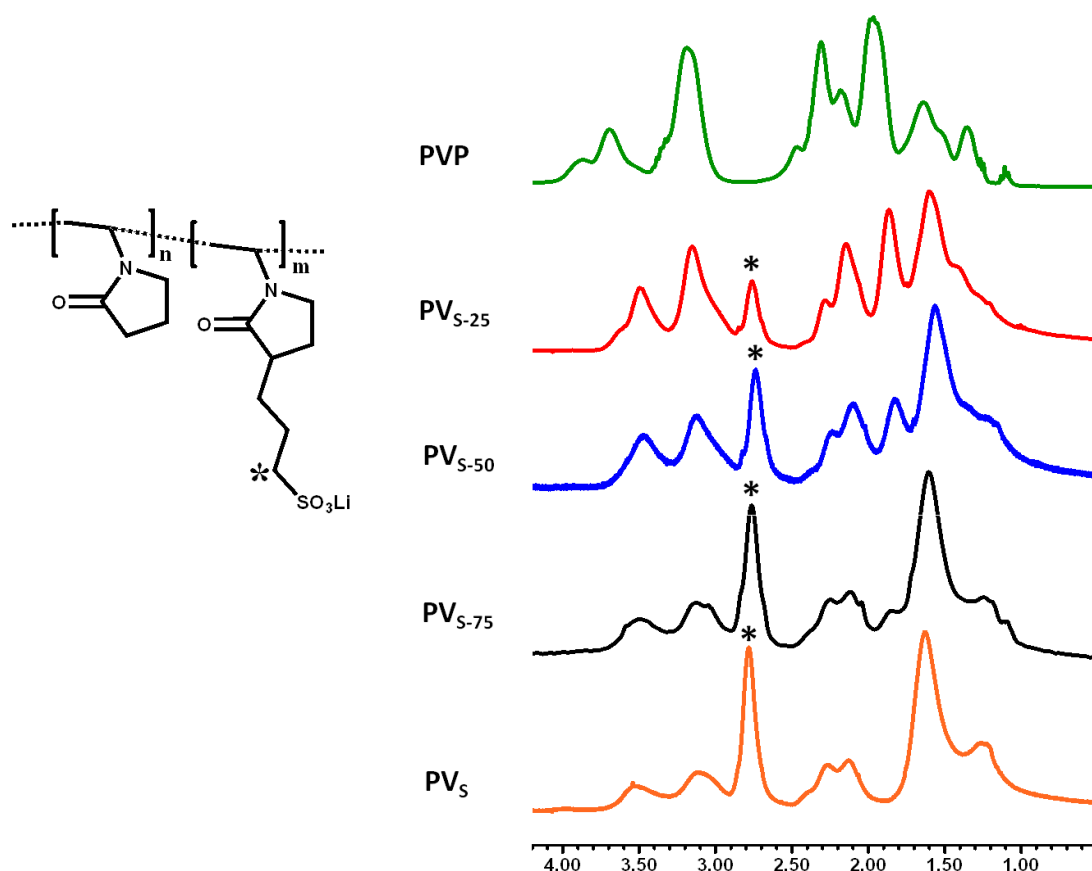


Figura 4: Espectros ^1H -RMN de los copolímeros VP-stat- V_s en D_2O .

Como se ha descrito en la introducción, la distribución de los grupos sulfonatos a lo largo de la cadena polimérica parece estar directamente relacionada con la actividad *in vitro*¹⁹ de los polímeros. Parece que es necesaria la presencia de dos grupos sulfonatos adyacentes para que la macromolécula tenga actividad antiangiogénica. Los copolímeros preparados en este trabajo presentan una distribución estadística de secuencias, incluidas las V_s - V_s que incluyen sulfonatos adyacentes. En la Tabla 2 se muestran las fracciones molares de diadas portadoras de unidad V_s , obtenidas teóricamente como se ha descrito en la sección experimental.

En la Tabla 2 se puede observar que los copolímeros estadísticos presentan efectivamente diadas V_s - V_s , siendo su población relativa (expresada en la Tabla en términos de fracciones molares) dependiente lógicamente de la composición de V_s en el copolímero. Dichas diadas pasan de ser las secuencias minoritarias en PV_{s-25} a las mayoritarias en PV_{s-75} .

Tabla 2: Fracciones molares de diadas para los copolímeros estadísticos poli(VP-stat-Vs)

Polímero	Fracciones molares de diadas	
	f_{Vs-Vs}	f_{Vs-VP}
PVP	-	-
PV_{S-25}	0.10	0.33
PV_{S-50}	0.28	0.45
PV_{S-75}	0.57	0.34
PV_S	1	-

Con el fin de preparar un sistema de control negativo sin secuencias Vs-Vs, se han preparado por polimerización radical convencional en DMF una serie de copolímeros alternantes a partir de maleato de metilo (MALME) y Vs (ver Figura 5) y VP-MALME (como control) mostrados en la Tabla 3.

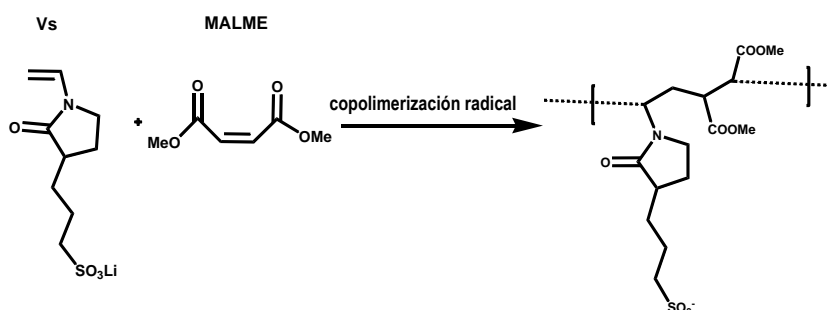


Figura 5: Estructura de los copolímeros alternantes entre Vs y derivados de maleatos

Tabla 3: Nomenclatura, composición en VP o Vs de los copolímeros alternantes, expresada en fracciones molares, en la alimentación y en los copolímeros, peso molecular e índice de polidispersidad.

Copolímero	F_{VP}	F_{Vs}	$f_{VP^a)}$	$f_{Vs^a)}$	M_n (kDa) / $PI^b)$
P(VP-<i>alt</i>- MALME)	0.5	-	0.49	-	19/1.6
P(Vs-<i>alt</i>- MALME)	-	0.5	-	0.46	10/1.2

a) Obtenido del análisis por RMN, como se describe en la sección experimental

b) Obtenido del análisis por GPC. PI = Polidispersidad

Las fracciones molares en el copolímero, obtenidas como se detalla en la parte experimental, muestran una incorporación casi total de las unidades VP y Vs. Los pesos moleculares de los copolímeros alternantes entre MALME y VP o Vs son inferiores a los de los copolímeros estadísticos entre VP y Vs y las polidispersidades son

muy bajas. De acuerdo a nuestra experiencia relativa a las dificultades en el uso de DMF como disolvente de la polimerización de VP y a la literatura²⁰, se puede estar produciendo una significativa transferencia a DMF (también observada en el capítulo 4). Sin embargo, no ha sido posible encontrar un disolvente alternativo para llevar a cabo la polimerización (para una explicación más detallada de la influencia de la transferencia, ver la discusión teórica de la transferencia en el capítulo 2).

Los dos copolímeros se hidrolizaron en NaOH obteniéndose los correspondientes copolímeros alternantes hidrolizados: P(VP-*alt*-MA) y P(VP-*alt*-MA) siendo MA el maleato resultante de la hidrólisis del maleato de metilo (MALME).

Los espectros de resonancia de protón de los copolímeros alternantes se muestran en la figura 6. La señal a 3.70 ppm es la más representativa de los maleatos de metilo ya que en ella se solapan las señales de O-CH₃ y de los CH₂ de cadena en un pico intenso. Tras la hidrólisis la intensidad de la señal disminuye correlativamente y se produce un desdoblamiento de la banda. La señal a 2.77 ppm corresponde a -CH₂SO₃- y es la más representativa de la unidad Vs.

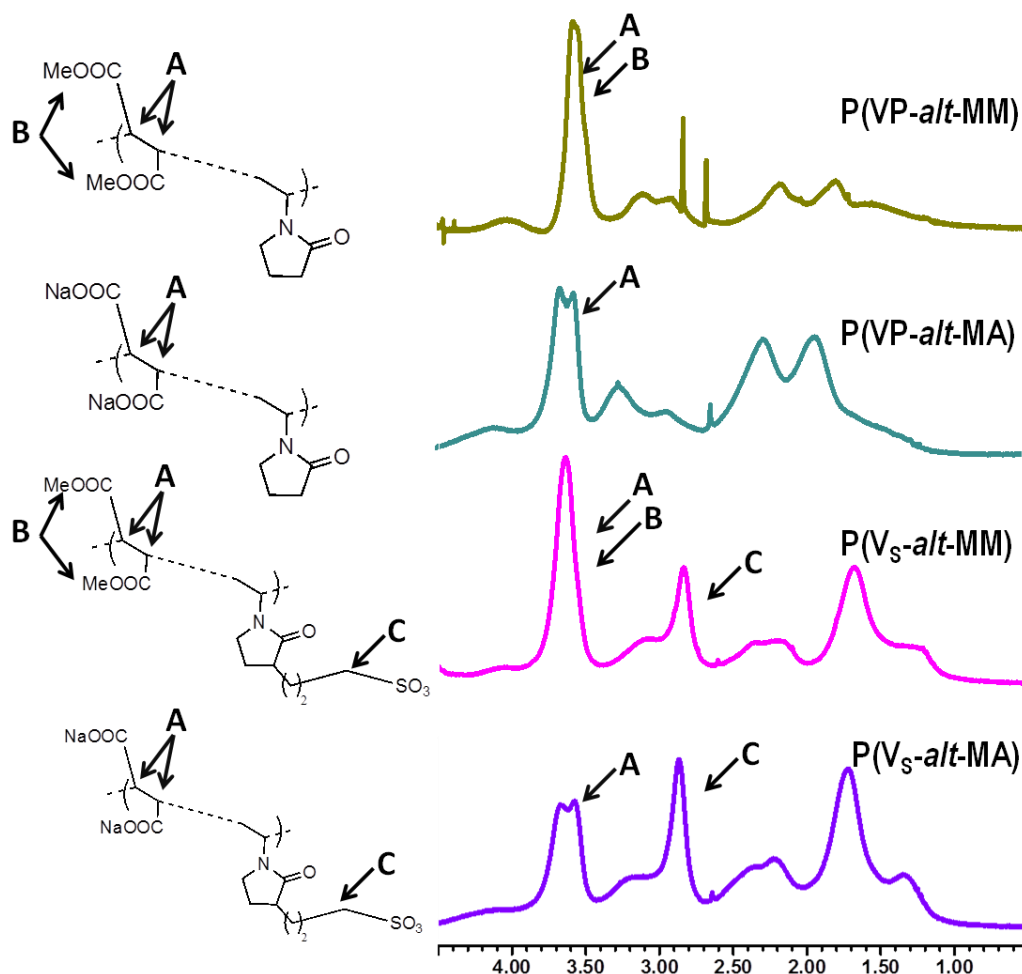


Figura 6: Espectros ^1H -RMN de los copolímeros alternantes en d_6 -DMSO y sus señales características.

Para confirmar la alternancia en la estructura de los copolímeros entre Vs y MALME se siguió la copolimerización por RMN ARRAY dinámico de dos reacciones Vs/MALME (2:1) y Vs/MALME (1:2), recogiendo múltiples espectros en el transcurso de la reacción. El consumo de monómeros Vs y MALME en función de la conversión se ha determinado como se indica en la sección experimental y se detalla en la Figura 7 para dos reacciones control con exceso de Vs y MALME respectivamente. Se eligen estas dos composiciones con exceso de cada uno de los dos monómeros para demostrar la alternancia. Se confirmaría una gran tendencia a la alternancia entre Vs y MALME en el crecimiento de la cadena macromolecular si ambos monómeros se consumieran por igual a lo largo de toda la reacción independientemente de la fracción molar en la alimentación.

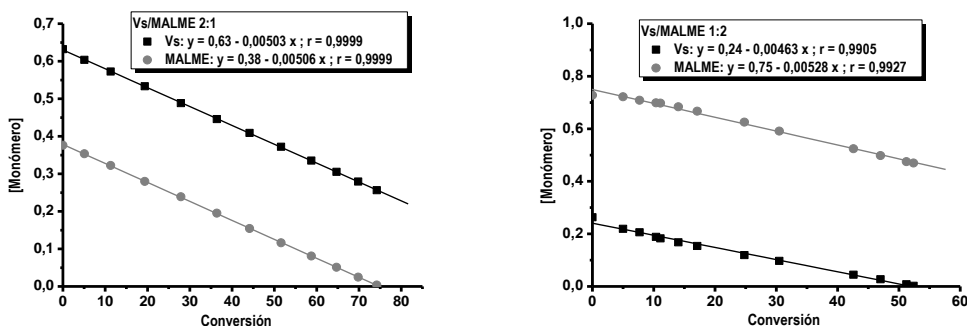


Figura 7: Concentraciones de Vs y MALME a lo largo de la reacción de polimerización monitorizada por RMN ARRAY dinámico.

Las gráficas de la Figura 7 muestran como las pendientes de las rectas que representan el consumo de monómeros a lo largo de la reacción son muy similares para ambos monómeros, lo que demuestra que se están consumiendo prácticamente en la misma proporción. Una cadena en crecimiento terminada en Vs reacciona casi exclusivamente con MALME y la cadena resultante terminada en MALME solo reacciona con Vs hasta que se agote uno de los dos monómeros. En el caso de Vs/MALME (1:2) la reacción no progresa tras consumirse Vs puesto que MALME es un monómero no homopolimerizable.

3.2. Ensayos de citotoxicidad de los copolímeros lineales

La citotoxicidad de los copolímeros lineales poli(VP-*stat*-Vs) se ha estudiado con en el ensayo Picogreen a distintas concentraciones de polímero. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 8. Se ha empleado PVP como control dado su conocido carácter biocompatible. En el ensayo se ha evaluado la citotoxicidad de los polímeros en función de la cantidad de ADN recuperado representativo del número de células vivas presentes.

La gráfica de la Figura 8 se muestra claramente como en todos los sistemas la viabilidad celular es independiente de la concentración de grupos sulfonatos en la estructura puesto que no hay una diferencia en la cantidad de ADN recuperado entre los diferentes copolímeros. El resultado de los copolímeros es similar al de la PVP pura mostrando de esta forma como la introducción del monómero Vs no modifica el carácter biocompatible de la PVP original.

De la misma forma se evalúa la citotoxicidad de los copolímeros alternantes sintetizados P(VP-*alt*-MALME) y P(Vs-*alt*-MALME). Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 9.

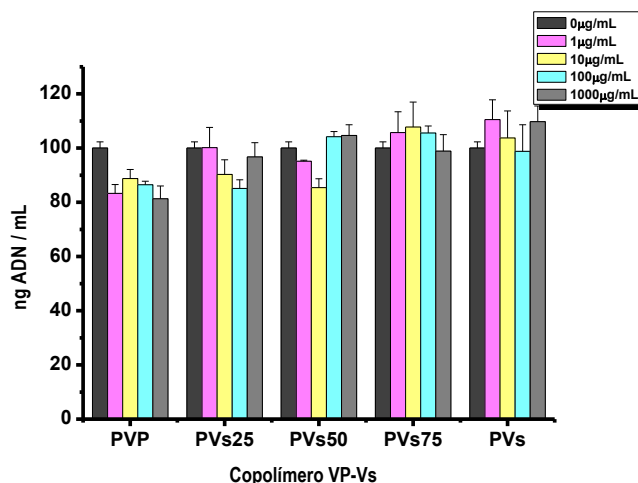


Figura 8: Cantidad de ADN equivalente al número de células vivas medido para los copolímeros con diferentes cantidades de Vs utilizando PVP como referencia. Los experimentos se realizaron a concentraciones de polímero 0, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL (en la figura gris, rosa, amarillo, azul y gris claro respectivamente).

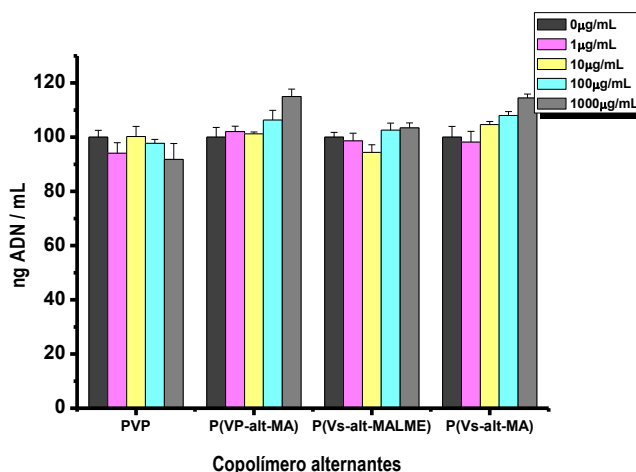


Figura 9: Cantidad de ADN equivalente al número de células vivas medido para los copolímeros alternantes utilizando PVP como referencia. Los experimentos se realizaron a concentraciones de polímero 0, 1, 10, 100 y 1000 µg/mL (en la figura gris, rosa, amarillo, azul y gris claro respectivamente).

El resultado del ensayo con los copolímeros alternantes vuelve a mostrar el carácter no citotóxico de todos ellos siendo este comparable a la PVP pura empleada como control.

3.3. Análisis de bioactividad de los copolímeros lineales: antiangiogénesis

Para evaluar la actividad antiangiogénica de los copolímeros poli(VP-*stat*-Vs) se realiza el ensayo descrito en la parte experimental. En este ensayo se hace competir la heparina con el polímero, es decir, la capacidad de ambos para unirse al factor de crecimiento de fibroblastos aFGF. Si la interacción heparina-aFGF impera se producirá crecimiento celular y si es la interacción polímero-aFGF la mayoritaria el crecimiento celular se verá inhibido. Se ha realizado también el experimento con PVP como control por su carácter biocompatible y no presentar ningún grupo sulfonato capaz de interaccionar con el factor de crecimiento aFGF. La Figura 10 muestra la actividad de los copolímeros poli(VP-*stat*-Vs) en la inhibición de aFGF.

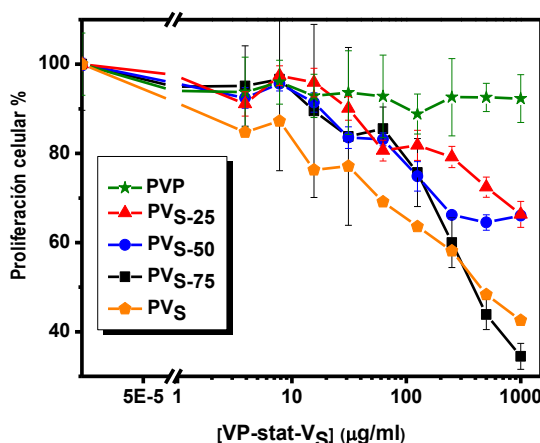


Figura 10: Resultados de ensayos de inhibición de aFGF.

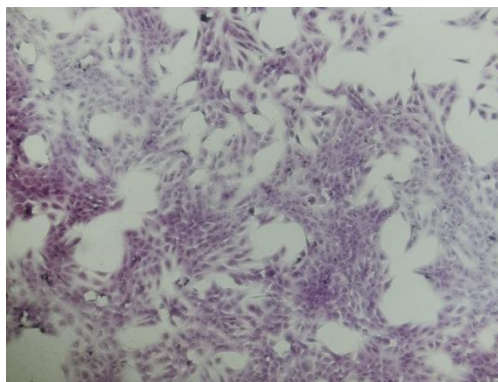
Analizando los ensayos se observa como a bajas concentraciones de polímero impera la interacción heparina-aFGF siendo por lo tanto la proliferación celular mucho mayor que en los controles debido al efecto angiogénico. Al ir aumentando la concentración de polímeros vemos como para PVP la proliferación celular se mantiene puesto que PVP no es capaz de competir con la heparina y por lo tanto no inhibe el crecimiento celular. Sin embargo todos los copolímeros poli(VP-*stat*-Vs) presentan actividad antiangiogénica al producir un descenso en la proliferación celular.

De acuerdo con los resultados de la Figura 10 la proliferación celular debida a aFGF se ve más inhibida cuantas más unidades de Vs existen debido a la interacción iónica directa entre los grupos sulfonatos del polímero y los factores de crecimiento.

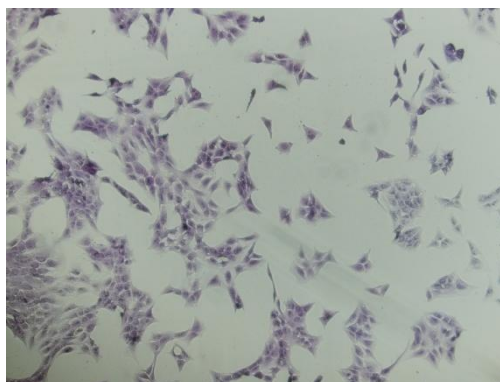
El sistema más activo a 1000 μg/mL es el copolímero PVs-75, con una actividad incluso mayor a la del homopolímero PVs. Este comportamiento puede explicarse considerando que de acuerdo al carácter macromolecular del sistema, no solo influye la cantidad de grupos sulfonatos adyacentes sino que también tienen un papel importante en la interacción con los sitios de activación del factor de crecimiento la secuencia de distribución y la configuración estereoquímica de los grupos sulfonatos adyacentes. PVs y los copolímeros poli(VP-*stat*-Vs) son predominantemente sindiotácticos ²¹, y es probable que no todos los grupos sulfonatos sean

activos en el homopolímero por impedimentos estéricos de la secuencia sindiotáctica. Sin embargo la incorporación de unidades VP en el copolímero PVs-75 proporciona mayor movilidad al entorno de las unidades sulfónicas bioactivas con una mejor orientación de los segmentos activos respecto a las moléculas de factor de crecimiento.

Sin polímero



125 µg/mL PV_{S-75}



1000 µg/mL PV_{S-75}

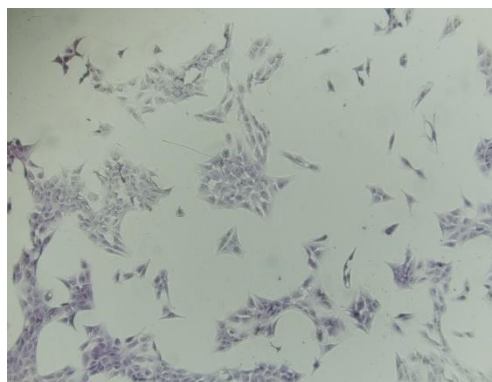


Figura 11: Micrografías ópticas del ensayo antiangiogénico sin polímero, con 125µg/mL de PVs-75, con 1000µg/mL de PVs-75.

Esta inhibición en el crecimiento celular se puede observar de manera más visual en las micrografías ópticas de la Figura 11 donde se ve como al aumentar la concentración de PVs-75 disminuye el número de células.

El ensayo antiangiogénico se ha realizado en las mismas condiciones con los copolímeros alternantes sintetizados. Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 12.

Los copolímeros alternantes no muestran inhibición de aFGF mientras que los copolímeros estadísticos muestran una clara inhibición dependiente de la concentración. Puesto que ambos presentan Vs en su estructura la diferencia en su actividad puede ser debida a la ausencia de diadas Vs-Vs en la estructura de los copolímeros alternantes.

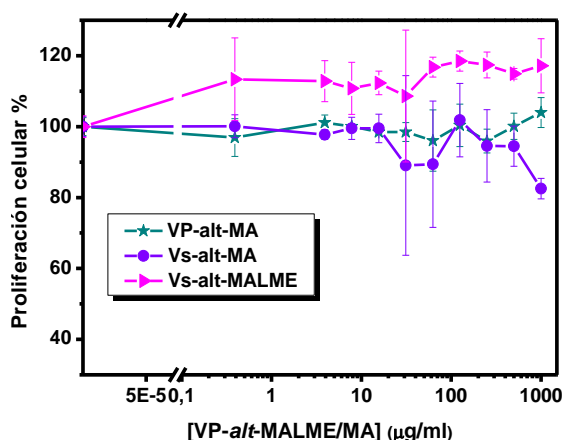


Figura 12: Resultados de ensayos de inhibición de aFGF.

El estudio conjunto de los resultados de los copolímeros alternantes y los copolímeros poli(VP-*stat*-Vs) parece confirmar que, de acuerdo con los datos de la Tabla 2, la proliferación celular se ve más inhibida cuanto mayor es la fracción molar de diadas Vs-Vs presentes en las cadenas y la interacción de los copolímeros con el factor de crecimiento requiere de unidades de Vs vecinas para adquirir la orientación óptima para interaccionar con FGF.

3.4. Redes: Preparación, caracterización y citotoxicidad

El monómero Vs y el entrecruzante VV sintetizados en el capítulo uno permiten la síntesis de redes de PVP funcionalizada. Como se describió en el capítulo dos el entrecruzante VV permite la síntesis de redes homogéneas al tener dobles enlaces homólogos a VP y Vs. En este trabajo se han sintetizado por fotopolimerización en masa las redes de la Tabla 4 siguiendo el esquema de la Figura 13.

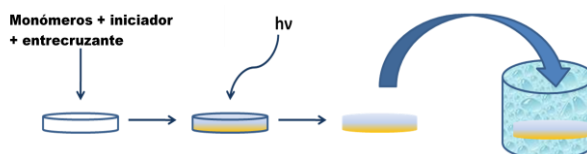


Figura 13: Esquema de síntesis de las redes y posterior hinchamiento en agua hasta el equilibrio.

Dado el carácter hidrofílico de la vinilpirrolidona estas redes absorben una cantidad relativamente alta de agua como se muestra en los datos de absorción hasta el equilibrio de la Tabla 4. Debido a esta alta capacidad de absorción de agua se eligen unos porcentajes de entrecruzamiento relativamente elevados (5 y 10%) para evitar que las redes se hinchen tanto que no sean manejables.

Tabla 4: Nomenclatura, composición inicial y experimental de las redes.

Red	F_{V-V}	F_{V_S}	$f_{V-V}^{a)}$	$f_{V_S}^{a)}$	$gH_2O/g \text{ polímero}^{b)}$
RPVP-1	0.05	0	0.04	0	2.50
RPVP-2	0.10	0	0.10	0	0.90
RV _{S-0.05}	0.10	0.05	-	0.05	0.88
RV _{S-0.10}	0.10	0.10	-	0.10	1.04
RV _{S-0.20}	0.10	0.20	-	0.18	1.06

a) Obtenido por análisis elemental, como se describe en la sección experimental

b) Absorción de agua obtenido por análisis de TGA

siendo RPVP las redes de VP pura con diferente grado de entrecruzamiento y RV_{S-x} las redes formadas por los copolímeros entre VP y V_S donde x representa la fracción molar en alimentación de V_S.

Los datos de análisis elemental confirman que la incorporación de V_S a las redes es prácticamente completa por ser la fracción molar en la red prácticamente la misma a la fracción molar en alimentación. Las redes RPVP-1 y RPVP-2 muestran cómo la cantidad de agua absorbida en las redes puede ser modulada por la densidad de entrecruzamiento. También se puede observar que la cantidad de agua absorbida por las redes copoliméricas RV_{S-x} es similar a la absorción por las redes RPVP-2 (todas con el mismo grado de entrecruzamiento) lo que indica que todas ellas probablemente están en su máximo de expansión al no verse afectadas por la cantidad de V_S introducida (una unidad cargada con gran capacidad de solvatación e hidratación).

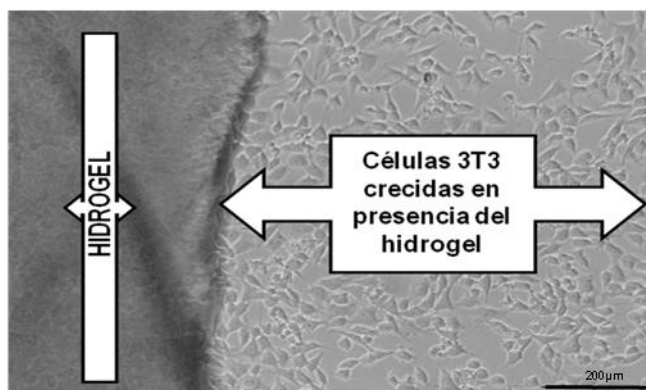


Figura 14: Fibroblastos 3T3 crecidos en presencia de los hidrogeles sintetizados.

La citotoxicidad de las redes RPVP y RV_{S-x} se ha estudiado sembrando células en su presencia e incubandolas 48h. Como se observa en la Figura 14 las células se fijan y crecen en presencia del hidrogel y además se aprecia como no hay células en la superficie del hidrogel debido a la alta hidrofilia de la red. Esto demuestra que las redes son citocompatibles.

4- Conclusiones:

La ruta bottom up empleada en este trabajo permite sintetizar auténtica PVP sulfonada lineal con control de carga manteniendo la estructura del esqueleto de la PVP y consiguiendo una funcionalización homogénea dada la semejante reactividad de VP y V_S. Además, el entrecruzante VV permite sintetizar redes con densidad de entrecruzamiento homogéneo de PVP en las que se puede incorporar la funcionalidad sulfonato por adición de V_S a la copolimerización. En estas redes se puede controlar su hinchamiento en agua simplemente variando la cantidad de entrecruzante añadido.

Tanto la PVP sulfonada lineal como en soporte tipo hidrogel han resultado ser no citotóxicas mostrando una compatibilidad comparable a PVP.

Los copolímeros estadísticos poli(VP-*stat*-V_S) han mostrado actividad antiangiogénica siendo competidores efectivos frente a la heparina en la captura de los factores de crecimiento de fibroblastos. Se ha demostrado que la actividad de los copolímeros es tanto mayor cuanto mayor es la carga de V_S. El homopolímero PVs no es el polímero con mayor actividad antiangiogénica sino que el que presenta más actividad es el que tiene un 75% de Vs. Este hecho parece indicar que la conformación de la cadena influye en la interacción con aFGF.

Se han podido preparar copolímeros alternantes P(V_S-*alt*-MALME), los cuales no inhiben el crecimiento celular inducido por aFGF. Este resultado apoya la hipótesis de la necesidad de que existan dos unidades monoméricas sulfonadas adyacentes para que los polímeros muestren actividad antiangiogénica.

5- Bibliografía:

- 1 García-Fernández, L. *et al.* Anti-angiogenic activity of heparin-like polysulfonated polymeric drugs in 3D human cell culture. *Biomaterials* **31**, 7863-7872 (2010).
- 2 Fan, F., Schimming, A., Jaeger, D. & Podar, K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *Journal of oncology* **2012** (2011).
- 3 Folkman, J. in *Advances in Cancer Research* Vol. Volume 19 eds Sidney Weinhouse George Klein & Haddow Alexander) 331-358 (Academic Press, 1974).
- 4 Waksman, G. & Herr, A. B. New insights into heparin-induced FGF oligomerization. *Nature structural biology* **5**, 527 (1998).
- 5 Capila, I. & Linhardt, R. J. Heparin–protein interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 390-412 (2002).
- 6 García-Fernández, L. *et al.* Antimitogenic polymer drugs based on AMPS: Monomer distribution– bioactivity relationship of water-soluble macromolecules. *Biomacromolecules* **11**, 626-634 (2010).
- 7 Seymour, L. Review: Synthetic Polymers with Intrinsic Anticancer Activity. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **6**, 178-216 (1991).
- 8 Fernández, I. S. *et al.* Gentsic acid, a compound associated with plant defense and a metabolite of aspirin, heads a new class of in vivo fibroblast growth factor inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 11714-11729 (2010).
- 9 Lee, S. M., Kim, B. G., Ha, C. S., Chung, I. & Xie, D. Syntheses and Evaluations of Antitumor and Antiangiogenic Compounds Conjugated with 5-Fluorouracil and Ascorbic Acid. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **23**, 473-489 (2008).
- 10 Yan, G. P., Zhuo, R. X. & Zheng, C. Y. Study on the Anticancer drug 5-fluorouracil-conjugated polyaspartamide containing hepatocyte-targeting group. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **16**, 277-293 (2001).
- 11 Garcia-Fernandez, L. *et al.* Structure, Morphology, and Bioactivity of Biocompatible Systems Derived from Functionalized Acrylic Polymers Based on 5-Amino-2-naphthalene Sulfonic Acid. *Biomacromolecules* **11**, 1763-1772 (2010).
- 12 Giménez, V. *et al.* Demonstrating the importance of polymer-conjugate conformation in solution on its therapeutic output: Diethylstilbestrol (DES)-polyacetals as prostate cancer treatment. *Journal of controlled release* (2011).
- 13 Luxenhofer, R. *et al.* Structure-property relationship in cytotoxicity and cell uptake of poly (2-oxazoline) amphiphiles. *Journal of controlled release* **153**, 73-82 (2011).
- 14 Abe, Y. *et al.* Promotion of optimized protein therapy by bioconjugation as a polymeric DDS. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)* **6**, 251-258 (2006).

Capítulo 3

- 15 Kim, S., Wan Kim, S. & Bae, Y. H. Synthesis, bioactivity and specificity of glucagon-like peptide-1 (7–37)/polymer conjugate to isolated rat islets. *Biomaterials* **26**, 3597-3606 (2005).
- 16 Yamamoto, Y. *et al.* Poly (vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic acid) as a novel renal targeting carrier. *Journal of controlled release* **95**, 229-237 (2004).
- 17 Aguilar, M. R., Gallardo, A., del Mar Fernández, M. & San Román, J. In Situ Quantitative ¹H NMR Monitoring of Monomer Consumption: A Simple and Fast Way of Estimating Reactivity Ratios. *Macromolecules* **35**, 2036-2041 (2002).
- 18 Fernández-Tornero, C. *et al.* Leads for Development of New Naphthalenesulfonate Derivatives with Enhanced Antiangiogenic Activity CRYSTAL STRUCTURE OF ACIDIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR IN COMPLEX WITH 5-AMINO-2-NAPHTHALENESULFONATE. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 21774-21781 (2003).
- 19 Presta, M. *et al.* Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors. *Current pharmaceutical design* **9**, 553-566 (2003).
- 20 Sugihara, Y., O'connor, P., Zetterlund, P. B. & Aldabbagh, F. Chain transfer to solvent in the radical polymerization of N-isopropylacrylamide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **49**, 1856-1864 (2011).
- 21 Ebdon, J., Huckerby, T. & Senogles, E. The influence of polymerization conditions on the tacticity of poly (N-vinyl-2-pyrrolidone). *Polymer* **24**, 339-343 (1983).

Capítulo 4

**Influencia de PVP funcionalizada con aminas
aromáticas en los estados de agregación de la
porfirina TPPS**

1- Introducción:

En este trabajo se evalúa la influencia de PVP funcionalizada con aminas aromáticas en los estados de agregación de la porfirina TPPS, ya que la agregación es un parámetro importante que influye en la aplicabilidad de la porfirina en terapia fotodinámica (PDT). En las últimas décadas cromóforos como las porfirinas han sido empleados en el área biomédica debido a su eficiencia en la terapia fotodinámica anticancerígena¹. PDT es un tratamiento combinado luz-fármaco para el tratamiento de infecciones localizadas y enfermedades como la degeneración macular, el acné y otras alteraciones de la piel así como para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer²⁻³. La molécula activa en PDT es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que se genera gracias a la energía transferida por el cromóforo desde su estado excitado. El oxígeno en su estado singlete es una molécula altamente reactiva que al formar un aducto con sustratos orgánicos provoca la muerte celular⁴.

Normalmente, toda molécula que absorbe un fotón de luz de longitud de onda adecuada puede alcanzar alguno de sus estados excitados. Sin embargo, las reglas de la mecánica cuántica establecen que, en ciertos casos, como en el caso del oxígeno⁵⁻⁶, la probabilidad de absorción de un fotón para producir la excitación es muy baja, incluso nula. En estos casos, para poblar el estado excitado es necesario acudir al proceso de fotosensibilización, en el cual se transfiere la energía de excitación electrónica de una molécula a otra. La fotosensibilización supone la generación, mediante absorción de luz, del estado excitado de un colorante, llamado fotosensibilizador, de manera que éste, durante el tiempo de vida de su estado excitado, es capaz de ceder o transferir su exceso de energía a otra molécula presente en el medio, obteniéndose un estado excitado de la misma.

La acción fotodinámica de cualquier fotosensibilizador en un medio biológico es un puzzle que está fuertemente influenciado por las condiciones del entorno del colorante, incluidas la localización e interacciones del fotosensibilizador, la reactividad de las moléculas de alrededor y los objetivos biológicos, cinéticas de difusión, tiempos de vida de los estados excitados, factores que pueden determinar el mecanismo fotodinámico y la eficiencia de la terapia.

Una vez que el colorante es fotosensibilizado la energía absorbida puede transferirse a otras moléculas pero existen otras vías de emisión de esa energía. Siguiendo el diagrama de Jablonski (Figura 1) vemos como el colorante primero es excitado a un estado singlete excitado (A) y después esa energía puede ser emitida por tres vías, relajaciones térmicas a través de estados vibracionales (G), emisión radiativa denominada fluorescencia (B) o conversión interna al estado triplete (C). La relajación desde el triplete excitado al estado fundamental puede ser vía emisión radiativa denominada fosforescencia (D), relajación térmica (G) y transferencia electrónica y/o transferencia de energía a otras moléculas (F). Por lo tanto, la eficiencia de un fotosensibilizador en la generación de oxígeno singlete depende en alta medida de la cantidad de energía que se transfiere del estado singlete excitado al triplete excitado y de la energía que éste es capaz de transferir al oxígeno.

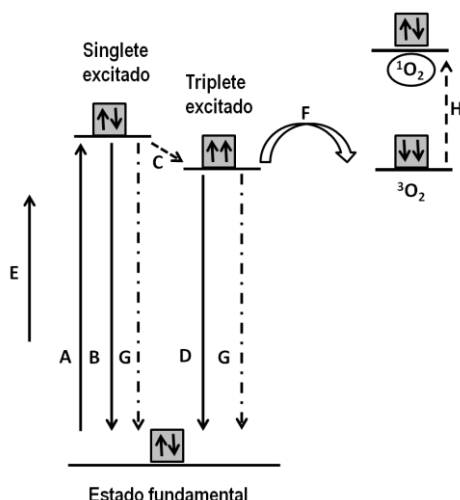


Figura 1: Diagrama de Jablonski con las distintas vías de excitación y relajación para un cromóforo: (A) excitación, (B) emisión de fluorescencia, (C) cruce intersistémico del estado singlete al triplete del cromóforo, (D) emisión de fluorescencia, (F) transferencia de energía no radiativa al estado fundamental triplete del oxígeno, (G) relajación no radiativa, (H) cruce intersistémico del estado triplete al singlete del oxígeno.

Los estados excitados o activados, a diferencia del estado fundamental, presentan configuraciones electrónicas que tienen una duración limitada, por lo que tienden a regresar a la configuración de mínima energía del estado fundamental pasado un corto lapso de tiempo. Este periodo puede tener una duración comprendida entre picosegundos (10^{-12}s) y milisegundos (10^{-3}s). Una molécula presenta un estado energético de carácter singlete cuando sus dos electrones más externos se encuentran apareados, es decir, cuando tienen números cuánticos de espines opuestos o antiparalelos. Por otro lado, una molécula presenta un estado energético de carácter triplete cuando sus dos electrones más externos se encuentran desapareados o paralelos, esto es, cuando tienen números cuánticos de espín iguales. Típicamente, el estado fundamental de la mayoría de las moléculas suele tener carácter singlete, mientras que los estados excitados de cualquier molécula pueden tener carácter singlete o triplete. El oxígeno en estado fundamental, es decir, con su configuración electrónica de mínima energía, tiene dos electrones desapareados o de espines paralelos, por lo que se trata de un estado de multiplicidad triplete. Por otro lado, su estado excitado de menor energía, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), posee dos electrones apareados o de espines contrarios.

El proceso de fotosensibilización, mediante el cual tiene lugar la fotogeneración de oxígeno singlete⁷ transcurre de la siguiente forma: en primer lugar una molécula de fotosensibilizador absorbe un fotón de luz ultravioleta o visible, generándose inmediatamente su estado excitado singlete. Dicho estado evoluciona rápidamente hasta un estado excitado triplete más estable y de tiempo de vida más largo, el cual puede colisionar con una molécula de oxígeno en estado fundamental. En dicha colisión, mediante un proceso de transferencia de energía por intercambio electrónico, se genera de nuevo el fotosensibilizador en estado fundamental y oxígeno singlete (ver esquema Figura 2). En el proceso global el exceso de energía de excitación de la molécula del colorante fotosensibilizador se transfiere al oxígeno presente en el medio mediante una colisión que ocurre durante el tiempo de vida del estado excitado del fotosensibilizador, resultando así la

formación de oxígeno singlete. El estado triplete excitado del colorante ha de tener al menos la misma energía que el estado fundamental del oxígeno para que se produzca la transferencia. El proceso es fotocatalítico pues únicamente se consumen luz y oxígeno, ya que el fotosensibilizador se recupera sin modificación alguna al final del proceso.

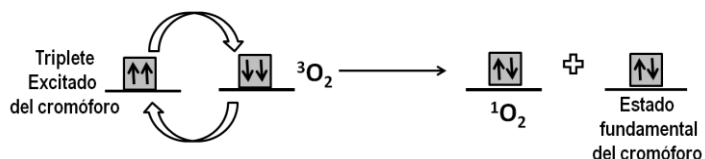


Figura 2: Proceso de generación de oxígeno singlete a partir de la colisión con el estado triplete excitado del cromóforo.

Las propiedades⁵ de un fotosensibilizador ideal para PDT son baja toxicidad, alto rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$, capacidad de absorber luz de longitudes de onda de entre 400-750 nm, preferentemente de más de 600 nm (longitud de onda a la que se produce la máxima penetración en los tejidos) y que posea propiedades farmacocinéticas tales como una alta selectividad por tejido diana, solubilidad en agua y eliminación en un tiempo razonable del organismo y de la piel para evitar reacciones de fotosensibilidad en los tejidos.

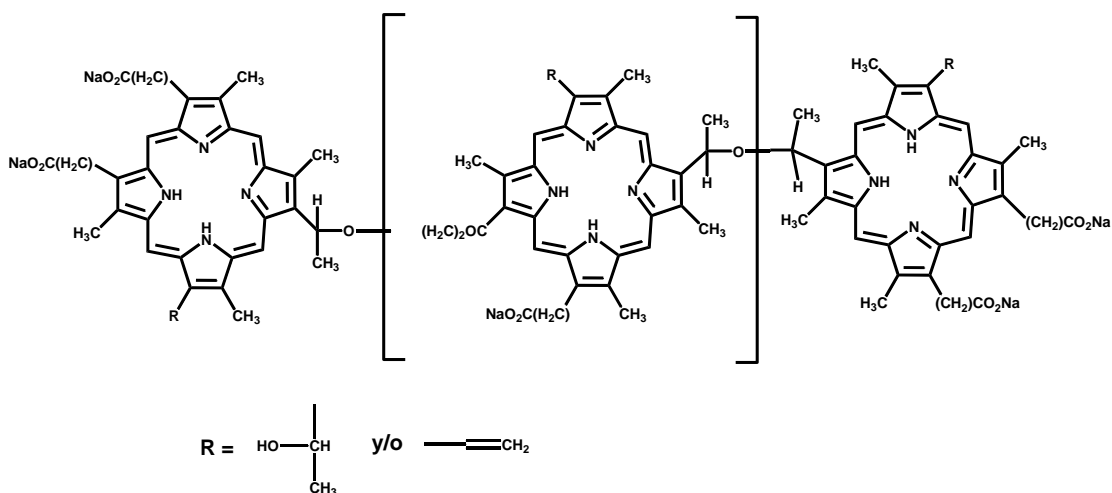


Figura 3: Estructura del Photofrin

Actualmente los fotosensibilizadores más usados en PDT *in vivo* son porfirinas, clorinas y bacterioclorinas⁸. Sin embargo también se están utilizando otras clases de porfirinoides, como las ftalocianinas, purpurinas y texapirinas, así como el azul de metileno⁹⁻¹⁰. Todos estos compuestos son eficaces generadores de $^1\text{O}_2$ puesto que presentan una alta eficiencia de transferencia de energía a su estado triplete excitado. El fotosensibilizador más estudiado y usado hasta la fecha, y uno de los pocos aprobados por los organismos reguladores es el Photofrin®¹¹ (QLT PhotoTherapeutics, Vancouver, Canadá) formado por una mezcla de oligómeros de hasta 8 unidades de porfirina (Figura 3). Está aceptado por la FDA¹² norteamericana y en muchos otros países para el tratamiento de cánceres de pulmón, esófago, vesícula, gástricos y uterinos. Su máximo de absorción está a 630 nm, con lo que puede activarse en el tejido hasta una profundidad de 5 mm. Además no parece tener límite

Capítulo 4

acumulativo, al contrario de lo que sucede con quimioterapia y radioterapia. A las dosis usadas no es cancerígeno ni mutagénico¹³. Se acumula en la piel, por lo que quemaduras solares o fotorreacciones pueden ser las posibles complicaciones. Estos efectos secundarios pueden minimizarse evitando la exposición a la luz solar o luz de alta intensidad durante al menos 6 semanas después del tratamiento.

La agregación de los colorantes disminuye la eficiencia de los mismos en la generación de oxígeno singlete al disminuir la concentración de colorante en el medio así como el rendimiento cuántico de fluorescencia y el tiempo de decaimiento¹⁴⁻¹⁵. Si se consigue controlar el estado de agregación de los colorantes se podría maximizar su rendimiento a la hora de producir oxígeno singlete. La agregación molecular modifica drásticamente las características de absorción (desplazando y desdoblado las bandas) de los colorantes por lo que la espectroscopía UV-Vis es una técnica útil para observar la formación de estos agregados. Para interpretar los cambios en las características de absorción del colorante cuando agrega se puede recurrir a la teoría de excitación del excitón molecular.

La teoría del excitón molecular¹⁶⁻¹⁸ es un método de mecánica cuántica que considera la interacción electrostática entre los momentos dipolares de las unidades monoméricas. Esta teoría predice un diagrama de energía y un comportamiento fotofísico diferente de los dímeros dependiendo de la geometría en la que se distribuyan las unidades monoméricas. La teoría de excitación analiza el comportamiento energético de la agregación en forma de dímeros y puede hacerse extensiva a agregados de mayor orden. Esta teoría sugiere un desdoblamiento del estado excitado de la forma monomérica para el caso de los dímeros. El gap de energía y la probabilidad de transición desde el estado fundamental a estos estados excitados depende de la orientación relativa de los vectores de los momentos de transición de las unidades monoméricas en el agregado. Para agregados en los que los vectores de los momentos de transición de las unidades monoméricas son paralelos, existen dos casos específicos atendiendo al ángulo formado entre la dirección de los momentos dipolares y la línea de unión de los centros moleculares (θ) (ver Figura 4). Si θ se aproxima a 90° , los monómeros forman el llamado agregado H (tipo sándwich) y la transición permitida produce un desplazamiento de la banda a mayores energías (banda H) y una disminución de la intensidad de fluorescencia. Si θ se aproxima a 0° , los monómeros forman el llamado agregado J (cabeza-cola), la transición permitida produce un desplazamiento de la banda a menores energías (banda J) disminuyendo también la energía de fluorescencia. Cuando los vectores de los momentos dipolares no sean paralelos aparecerán tanto la banda H como la J y sus intensidades relativas dependerán del ángulo entre los momentos de transición de ambas moléculas en el dímero (α), formando agregados tipo sándwich retorcido, para el cual la banda H es más intensa que la J, o cabeza-cola oblicuo, para el cual la banda J es más intensa que la H.

Una posible estrategia para controlar la agregación del cromóforo es complejarlo a polímeros capaces de producir interacciones específicas entre el colorante y grupos funcionales presentes en el polímero. Sin embargo, la desagregación de los colorantes en presencia de polímeros depende en alta medida de la estructura del polímero como conjunto y por lo tanto variables como la funcionalidad, la localización de la carga, flexibilidad, hidrofobicidad, densidad lineal de carga y densidad lineal aromática determinan el comportamiento del sistema.

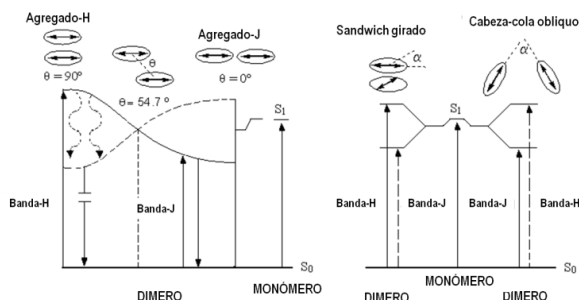


Figura 4: Esquema del desdoblamiento producido en las bandas al agregarse el colorante. Donde S_0 es el estado fundamental y S_1 el estado excitado.

Cuando se ha intentado abordar la complejación de colorante y polímero por interacciones electrostáticas se ha observado cómo la presencia del polielectrolito lejos de controlar la agregación del colorante, la favorece¹⁹⁻²⁰. La interacción entre colorantes cargados y polímeros cargados complementariamente²¹⁻²⁴ suele ir acompañada de un mecanismo cooperativo de autoensamblado²⁵⁻²⁸, por medio del cual las moléculas de colorante se unen preferentemente adyacentes entre sí. Los colorantes podrían interaccionar con polímeros aromáticos por interacciones π - π aunque se conoce la habilidad de los colorantes de autoensamblarse por estas interacciones a pesar de tener la misma carga en su estructura.

En los últimos años el grupo del Dr. Moreno-Villoslada, con el que se colabora en este estudio, ha trabajado destacando las características de los polímeros aromáticos cargados, que proporcionan, mediante fuertes interacciones de corto alcance, uniones específicas a diferentes moléculas como los colorantes²⁹⁻³⁸. Los resultados muestran cómo los polielectrolitos que llevan en su estructura grupos aromáticos son capaces de establecer interacciones cuando las moléculas de bajo peso molecular, como los colorantes, tienen carga complementaria y presentan también grupos aromáticos. La interacción es incluso más fuerte cuando la carga se encuentra en el grupo aromático del polímero. Como se ha mencionado, los colorantes pueden agregarse por interacciones π - π , sin embargo, cuando el polielectrolito tiene grupos aromáticos cargados se produciría una competencia entre las interacciones aromático-aromático polímero-colorante con la agregación del colorante. Este comportamiento se ha observado en colorantes como los xantanos catiónicos con polianiones aromáticos y alifáticos^{30-31,36-37}. La presencia de grupos aromáticos en el polímero produce un fuerte anclaje del colorante a éste y por tanto un notorio cambio en el comportamiento químico y espectroscópico del colorante.

Los polielectrolitos aromáticos han resultado ser eficientes a la hora de influir en los estados de agregación de los colorantes por lo que copolímeros entre la VP y la V_N, sintetizada en el capítulo 1, (ver Figura 5) con aminas aromáticas protonables en su estructura serían moléculas con potencialidad para influenciar los estados de agregación de determinados colorantes. Además, dado el largo historial en aplicaciones biomédicas de la PVP detallado en la introducción de la tesis, en el que se incluyen aplicaciones en heridas abiertas como el caso del Betadine, una PVP con aminas aromáticas capaz de influir en los estados de agregación de un fotosensibilizador sería un polímero adecuado para la posible aplicación final en PDT.

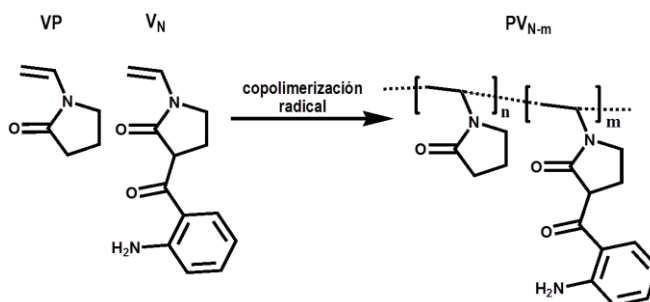


Figura 5: Esquema de la ruta de síntesis de los copolímeros Poli(VP-co- V_N)

Gracias al esfuerzo sintético llevado a cabo en la síntesis de V_N se puede preparar PVP funcionalizada con aminas aromáticas de una manera sencilla. La síntesis de copolímeros poli (VP-co- V_N) por polimerización radical convencional permitiría obtener PVP con aminas aromáticas distribuidas homogéneamente en el polímero. Como se ha analizado en el capítulo dos, la reactividad similar de las VPs funcionalizadas sintetizadas en este trabajo permite la copolimerización de dos monómeros con reactividad comparable eliminando así los problemas de heterogeneidad planteados al tratar de introducir la funcionalidad en PVP por copolimerización con monómeros de distinta naturaleza portadores del grupo funcional deseado. Además, esta distribución homogénea de los monómeros en el proceso de polimerización permite controlar la cantidad de carga de amina aromática introducida variando la composición en V_N en la alimentación. La posibilidad de controlar la cantidad de amina aromática introducida permitiría evaluar la influencia que esta ejerce en los estados de agregación del colorante al poder ir incrementándose en los distintos copolímeros.

Estos polímeros presentarían en su estructura grupos aromáticos y grupos cationizables por lo que se selecciona para el estudio una porfina con grupos anionizables y aromáticos para estudiar ambos tipos de interacciones. La porfina seleccionada fue la 5,10,15,20-tetraquis-(4-sulfonatofenil)-porfina (TPPS). Las dos formas en las que se encuentra mayoritariamente la TPPS en disolución acuosa son en su forma dianiónica H_4TPPS^{2-} (434nm), cuando se protonan las aminas de los anillos pirrólicos (a pH menor de 5) y en su forma tetra-aniónica (414nm) H_2TPPS^{4-} a pH mayor de 5³⁹; sus estructuras se muestran en la Figura 6.

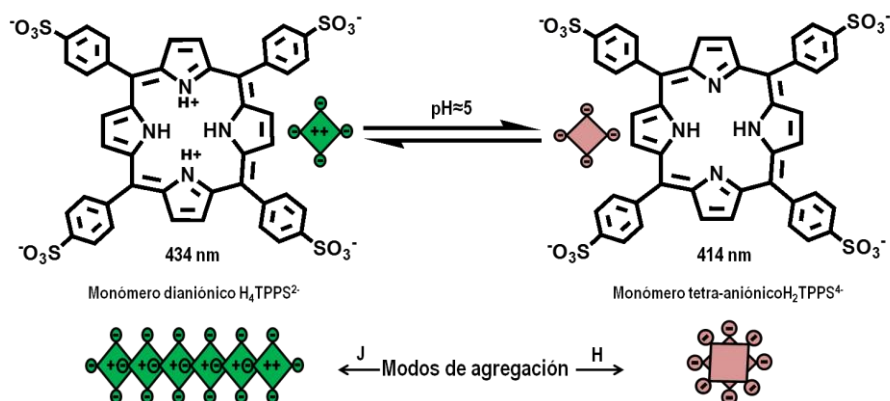


Figura 6: Estructuras de los monómeros dianiónico y tetra-aniónico de la TPPS y representación esquemática tanto de las formas monoméricas como de sus modos de agregación.

Las propiedades agregativas de la TPPS son ampliamente conocidas^{24,29,39-45}; puede formar agregados tipo H o tipo J. Los agregados tipo J se forman a pH < 5, cuando las porfirinas se protonan en sus anillos pirrólicos (H₄TPPS⁻²) y por tanto hay una interacción entre la carga positiva del centro de una molécula con la carga negativa de la periferia de otra, estabilizando así el agregado (el máximo de la banda se desplaza a 491 nm). En este caso, se producen múltiples apilamientos de colorantes ligeramente plegados por lo que se han descrito estructuras supramoleculares de forma cíclica^{29,38}. Los agregados tipo H se forman con la TPPS en su forma tetra-aniónica (H₂TPPS⁻⁴). Aparecen a concentraciones de porfirina relativamente altas o en presencia de cargas complementarias por ser una conformación no favorecida. H₂TPPS⁻⁴ en presencia del poli(alilamina) forma agregados H⁴⁶; aparece una banda intensa a 400 nm a expensas de la banda a 414 nm. Además, la forma tetra-aniónica se estabiliza desde pH 2,2 debido a la neutralización de la carga por el polímero.

En este trabajo se estudiará la influencia de polímeros portadores de aminas aromáticas basados en PVP, con distinta cantidad de V_N, en los estados de agregación de la porfirina TPPS. Se evaluará, como control, la interacción con quitosano, un polímero cationizable no aromático.

2- Experimental:

2.1. Reactivos:

La vinilpirrolidona (VP), de Aldrich, se destiló a presión reducida y se conservó a 4°C. El azobisisobutironitrilo (AIBN, Aldrich) se recrystalizó en etanol. La V_N se sintetizó como se describe en el capítulo 1. La 5,10,15,20-tetraquis-(4-sulfonatofenil)-porfirina (TPPS) (TCI), el quitosano (Qs) de Merk, así como el resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

2.2. Copolimerizaciones:

La polimerización se llevó a cabo disolviendo en DMF la VP y la V_N en una concentración total de monómero de 1M con AIBN como iniciador, en concentración 1.5×10^{-2} M. Se burbujó nitrógeno sobre esta disolución durante 30 minutos y posteriormente se introdujo en la estufa a 60°C durante 24 horas. Los polímeros obtenidos se denominaron de la siguiente manera: PV_N es el homopolímero de V_N y PV_{N-x} corresponde a los copolímeros poli(VP-co-V_N) donde x representa la fracción molar en alimentación de V_N. Los productos obtenidos se aislaron y purificaron por diálisis durante 48 horas en mezclas DMF/H₂O con membranas de cut-off 3500 aumentando progresivamente la cantidad de agua. Al incrementar el grado de modificación los copolímeros resultaron cada vez más insolubles en agua por lo que a partir de un 50% de V_N en alimentación precipitaron en la membrana de diálisis.

El análisis de la composición de los copolímeros se realizó por comparación de las integrales de las señales de resonancia de protón de los espectros mostrados en la Figura 7, considerando la banda entre 7.0-8.0ppm (2 CH-Ar y NH₂ (V_N)) y la banda de 1.0-2.4 ppm (O=C-CH-CH₂ V_N, O=C-CH₂-CH₂ VP y CH₂ cadena). Las correspondientes fracciones molares en el copolímero se calculan utilizando las ecuaciones 1-3:

$$A_{1.0-2.4} = 4H_{VN} + 6H_{VP} \quad (1)$$

$$A_{7.0-8.0} = 4H_{VN} \quad (2)$$

$$f_{VN} = \frac{H_{VN}}{H_{VN} + H_{VP}} \quad (3)$$

siendo A el área de la integral de la correspondiente banda obtenida mediante el software MestreNova® 6.

2.3. Evaluación del pK de la amina de VN

Para evaluar el pK de la amina de VN se preparó una disolución de PV_{N-10} (15mg/mL) en D₂O y se fue añadiendo repetidas veces 2μL de una disolución de HCl 10M en D₂O midiendo el pH y realizando espectros de ¹H-RMN entre cada adición de ácido (Figura 8). Se analizó el desplazamiento y relación de integrales de las señales aromáticas a 6.6 (2 CH-Ar) y 7.4 (1 CH-Ar)ppm por ¹H-RMN en función del pH.

2.4. Estudios de interacciones

Las interacciones entre la TPPS y los copolímeros se siguieron por espectroscopía UV-Vis empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y siguiendo los procedimientos convencionales. Se prepararon disoluciones acuosas con una concentración de 9 x 10⁻⁵ M de polímero y 1 x 10⁻⁶ M de TPPS permitiendo su equilibrado tras ajustar el pH durante varios minutos. La concentración de polímero se calculó como moles de grupos aromáticos por litro en el caso de los polímeros con carga aromática y moles de VP por litro en el caso de PVP. Todas las muestras se prepararon en agua destilada o mezclas H₂O/DMSO 90:10.

2.5. Formación de agregados polímero-colorante

Se siguió la posible formación de agregados polímero colorante por dispersión dinámica de luz (DLS). En los casos en los que se detectó agregación se prepararon muestras en el disolvente adecuado a una concentración de polímero de 9 x 10⁻⁵ M y concentraciones crecientes de 3 x 10⁻⁷ M a 9 x 10⁻⁶ M de TPPS por mezcla de ambos componentes bajo agitación vigorosa y se analizó el tamaño y potencial zeta de los precipitados por (DLS).

2.6. Equipos

Los espectros de ¹H-RMN se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 en D₂O o d₆-DMSO con TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala δ relativos a TMS. La composición se determinó por la intensidad de las integrales de las unidades de protón, como se ha descrito anteriormente.

El peso molecular se determinó por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) con un cromatógrafo Perkin Elmer con bomba isocrática conectada a un detector diferencial difractométrico (serial 200 a). Se acondicionaron las dos columnas a 70°C y se utilizó como eluyente para las muestras (3 mg/mL) DMF grado HPLC suplementado con 0.1% v/v de LiBr a 0,3 mL/min. El calibrado se realizó con patrones monodispersos de polietileno en el rango de 2.9 x 10³ a 480 x 10³ Da obtenidos de Scharlab.

El pH se ajustó con un pHmetro UltraBasic Denver. Las medidas de UV-Vis se realizaron en un espectrómetro Helios y.

El tamaño aparente y el potencial zeta se midieron en un equipo DLS Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern) con 173 ° de retrodispersión controlado con un software DTS 6.2, Malvern.

3- Resultados y discusión:

3.1. Síntesis de polímeros

Se han preparado los copolímeros poli(VP-co-V_N) mostrados en la Tabla 1 por polimerización radical convencional en DMF. Se han sintetizado copolímeros con cantidades crecientes de V_N variando la cantidad de V_N en la alimentación siendo la composición final en el copolímero prácticamente igual a la alimentación. En la Tabla 1 también se muestran los datos de pesos moleculares promedio en número y su polidispersidad, pudiendo observarse como el peso molecular entre los distintos copolímeros no varía significativamente y todos ellos presentan una baja polidispersidad en polimerización radical convencional. Tal y como se mencionó en el capítulo 3, de acuerdo a nuestra experiencia y a la literatura⁴⁷, se puede estar produciendo una significativa transferencia a DMF (para una explicación más detallada de la influencia de la transferencia, ver la discusión teórica de la transferencia en el capítulo 2).

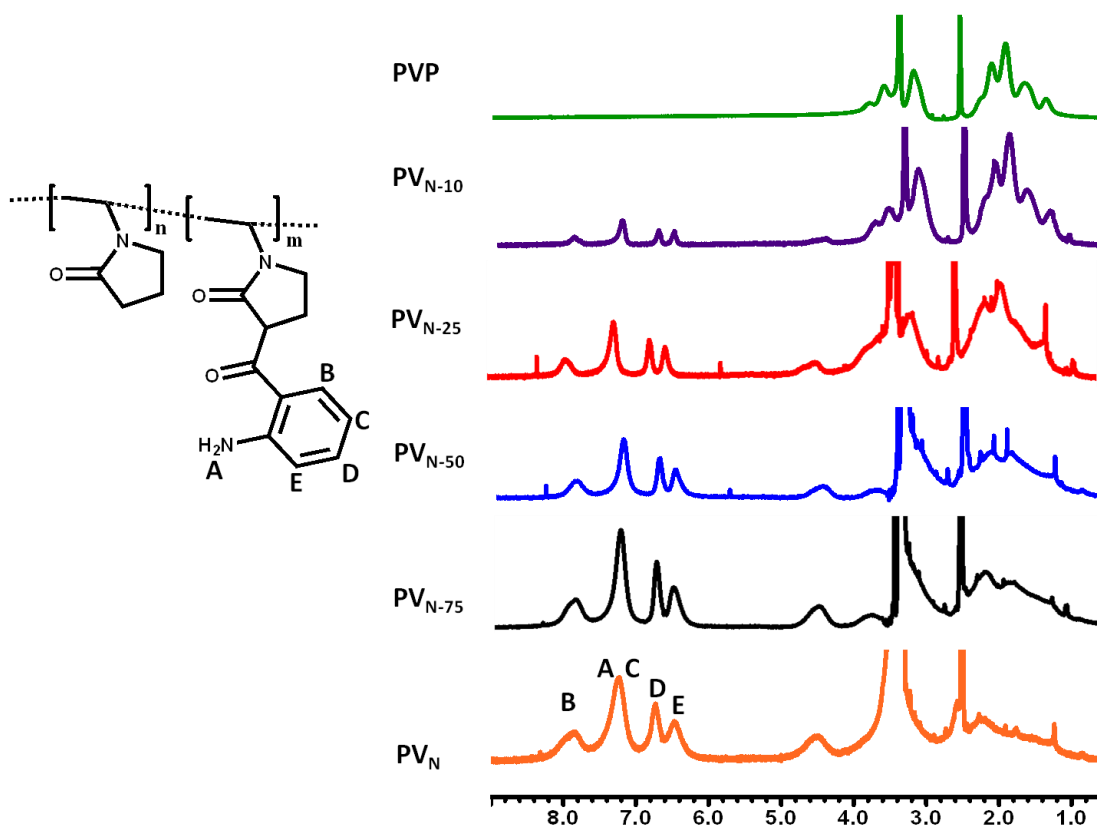


Figura 7: Espectros ¹H-RMN de los copolímeros en d₆-DMSO.

Capítulo 4

Tabla 1: Nomenclatura, composición en V_N , expresada en fracciones molares, en la alimentación y en los copolímeros, peso molecular e índice de polidispersidad.

Copolímero	F_{VN}	$f_{VN}^{a)}$	M_n (kDa) / $PI^{b)}$
PV_{N-10}	0.10	0.08	33 / 1.60
PV_{N-25}	0.25	0.23	41 / 1.62
PV_{N-50}	0.50	0.46	43 / 1.81
PV_{N-75}	0.75	0.74	34 / 1.77
PV_N	1	1	41 1.86

a) Obtenido del análisis por RMN

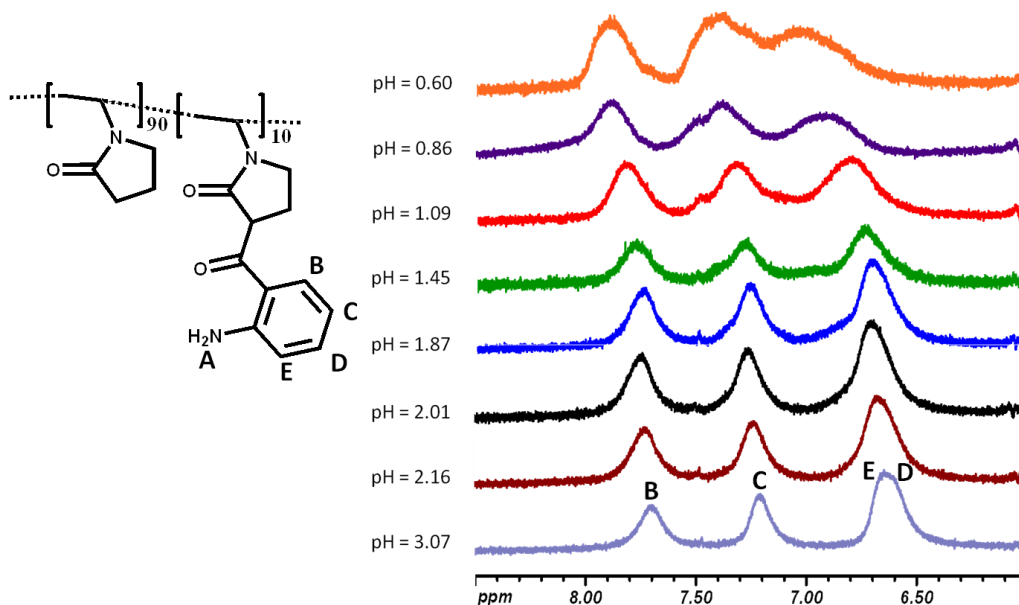
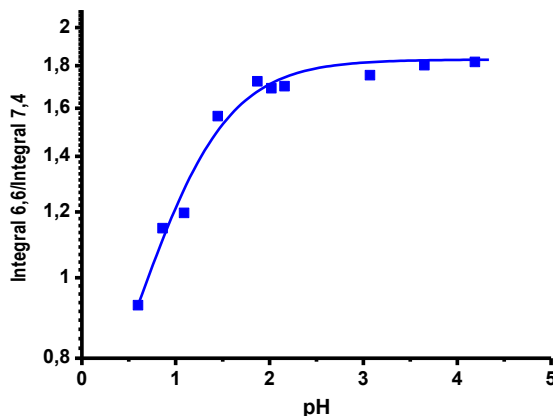
b) Obtenido del análisis por GPC. PI = Polidispersidad. Siendo PV_N el homopolímero de V_N y PV_{N-x} los copolímeros entre VP y V_N donde X representa la fracción molar en alimentación de V_N .

Para determinar la composición de los copolímeros se han utilizado las ecuaciones 1-3 descritas en la parte experimental empleando las integrales de los espectros de 1H -RMN. En la Figura 7 se muestran los espectros de los copolímeros sintetizados donde se puede apreciar claramente el aumento de la intensidad de las señales aromáticas y de la amina cuanto más rico en V_N es el copolímero.

La solubilidad de los copolímeros en agua disminuye al aumentar la cantidad de V_N (incluso en condiciones ácidas), siendo insolubles ya los copolímero con un 50% de V_N . El aumento en la cantidad de amina protonable que podría favorecer la solubilidad va ligado al aumento de grupos aromáticos presentes en el polímero (aumento en la hidrofobia del sistema). Sin embargo, polímeros cargados netamente aromáticos como el poliestirensulfonato son fácilmente solubilizados en agua. Al estudiar el pK de la amina por 1H -RMN (Figura 8) analizando el desplazamiento y relación de integrales de las bandas aromáticas, se ha determinado la baja capacidad de protonación de la amina aromática.

Se ha representado la relación entre los valores de las integrales de las señales aromáticas en torno a 6.6 y 7.4 ppm frente al pH (Figura 9). Entendiéndose el cambio en la relación de integrales de las señales aromáticas como indicativo de la protonación de la amina, se puede apreciar como la amina no empieza a protonarse de forma extensiva hasta un pH inferior a 2 siendo por lo tanto su $pK_b > 12$.

Esta dificultad en la protonación hace que no se favorezca la solubilidad en agua del polímero y por lo tanto imperan las fuerzas hidrofóbicas de los anillos aromáticos haciendo que a partir de PV_{N-50} sean insolubles en agua. Esta baja capacidad de protonación podría justificarse por la posibilidad de estabilización de una forma resonante en la que el protón de la amina podría formar un puente de hidrógeno con el carbonilo de la cadena en orto formándose un anillo hexagonal (Figura 10).

Figura 8: Espectros H-RMN del copolímero PV_N-10 en función del pH.Figura 9: Relación de las integrales a 6,6 ppm y 7,4 ppm en función del pH para el copolímero PV_N-10

En consecuencia PV_N-10 se solubiliza directamente en agua, PV_N-25 requiere condiciones ácidas para solubilizarse a una concentración de 10^{-4} M y PV_N-50, PV_N-75 y PV_N son insolubles en agua pero solubles en mezclas H₂O/DMSO 90:10. Todos ellos son solubles en DMSO y mezclas H₂O/DMSO 90:10.

El alto pK_b de la amina hace que las interacciones electroestáticas que puedan establecer los copolímeros por las unidades V_N estén minimizadas pero sigue pudiendo interaccionar por interacciones aromáticas e interacciones polares debido al grupo amina.

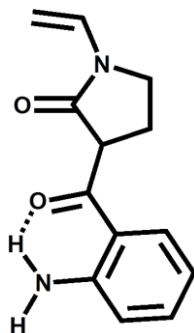


Figura 10: Estructura de la posible forma resonante justificativa de la baja capacidad de protonación de la amina de la VN

3.2. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS

Como se ha descrito en la introducción, en condiciones diluidas (10^{-6} M o inferior) las especies mayoritarias de la TPPS en disolución son la dianiónica (H_4TPPS^{2-}) a $pH < 5$ y la tetra-aniónica (H_2TPPS^{4-}) a pH mayor de 5³⁹. La banda principal de H_2TPPS^{4-} está centrada a 414 nm mientras que la correspondiente a H_4TPPS^{2-} está centrada a 434 nm como puede verse en la Figura 11 (líneas punteada y continua respectivamente). A pH próximo a 5 (línea discontinua) se observan las dos absorbancias a 434 nm y 414 nm por ser el punto de transición entre las dos formas monoméricas. En la Figura 11 (derecha) se observa claramente este punto de transición representando las correspondientes absorbancias normalizadas a su suma para todo valor de pH , es decir, la suma de las dos absorbancias en estas condiciones es igual a 1. Se puede ver como H_4TPPS^{2-} se convierte en la especie mayoritaria a pH menor de 4,9.

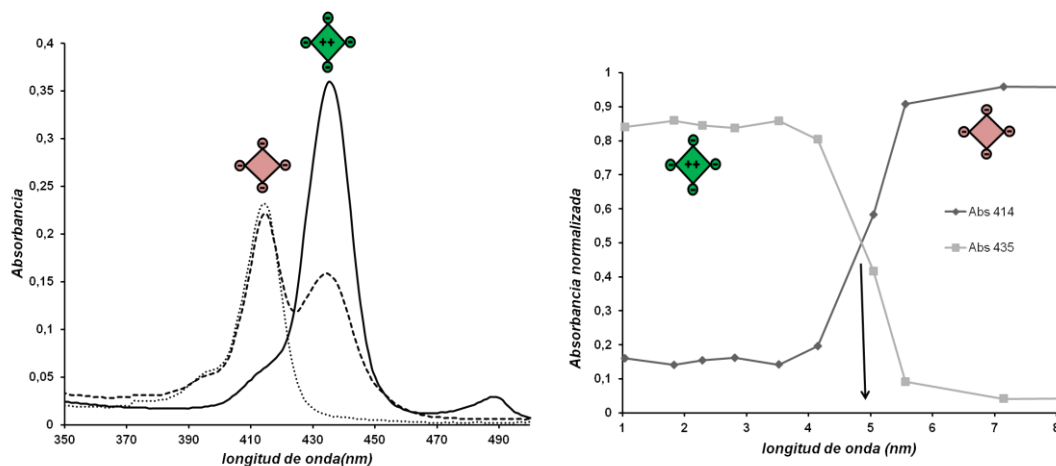


Figura 11: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M a pH 7.15 (línea punteada), pH 5.05 (línea discontinua), pH 1.83 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 434 nm (■) y 414 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M.

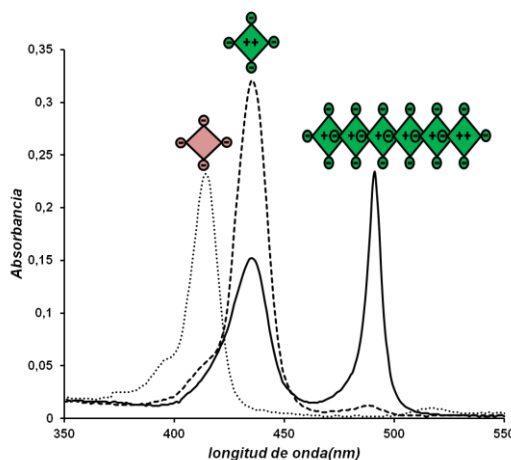


Figura 12: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas de TPPS en concentración 10^{-6} M a pH 7.15 (línea punteada), pH 1.83 (línea discontinua) y con TPPS en concentración 10^{-5} M a pH 2.09 (línea continua).

Si la concentración del colorante es mayor de 10^{-6} M, la forma H_4TPPS^{-2} tiende a agregar formando agregados de alto orden tipo J (cabeza-cola). Como consecuencia la banda se desplaza a menores energías y aparece una banda más intensa a 491 nm a expensas de la de 434 nm como se ve en la Figura 12. La facilidad del colorante para formar este agregado se basa en una adecuada configuración de las cargas de la molécula por ser un zwitterión. Al protonarse los pirroles, existen dos cargas positivas situadas en el centro de la molécula y cuatro negativas en la periferia de los grupos sulfónicos. Las interacciones aromático-aromático estabilizan el empaquetamiento de una molécula con otra mientras que se producen interacciones electrostáticas entre los grupos con cargas complementarias. Por el contrario H_2TPPS^{-4} no agrega tan fácilmente por su alta carga neta negativa, y por lo tanto no se observan cambios en su máximo de absorbancia cuando se aumenta la concentración de colorante.

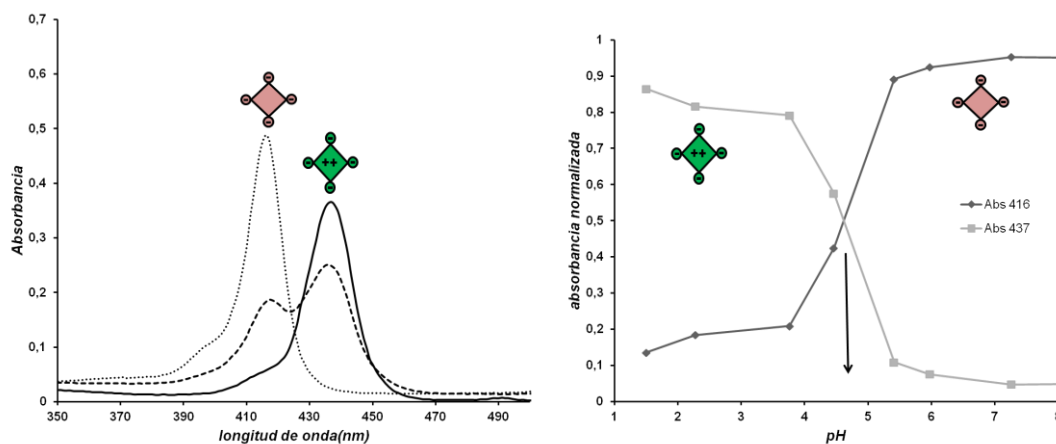


Figura 13: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones en mezclas H₂O/DMSO 90:10 con TPPS en concentración 10^{-6} M a pH 7.26 (línea punteada), pH 4.46 (línea discontinua), pH 1.50 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 437 nm (■) y 416 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M.

Capítulo 4

Puesto que algunos de los copolímeros son insolubles en agua pero solubles en la mezcla H₂O/DMSO 90:10, se analizó también el comportamiento de TPPS en esta mezcla de disolventes. La presencia del DMSO produce un pequeño desplazamiento en el pH de transición entre las dos formas monoméricas, disminuyendo a pH 4,8 como se puede ver en la Figura 13. Ambas especies monoméricas experimentan un desplazamiento de la banda principal a menores energías de forma que H₂TPPS⁴⁻ se mueve 2 nm (de 414 a 416 nm) y H₄TPPS²⁻ se mueve 3 nm (de 434 a 437 nm).

3.3. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de Quitosano

Como se ha destacado anteriormente el comportamiento habitual de los colorantes cargados en presencia de polímeros con carga complementaria es la formación de grandes agregados basados en contactos tipo H. Este comportamiento se debe frecuentemente a la naturaleza electrostática de la interacción entre el colorante y el polímero con carga complementaria. En el caso de la interacción entre colorantes cargados y polielectrolitos con cargas complementarias, la alta concentración local del colorante en torno al polímero por la atracción electrostática provoca su agregación.

Para estudiar como control esta interacción electrostática entre polímero y colorante se ha analizado la influencia de quitosano (Qs) (Figura 14) en las propiedades agregativas de TPPS. El Qs empleado en este estudio presenta un 85% de glucosamidas desacetiladas que por debajo de pH 5 son protonadas asegurando así su solubilidad en agua a pH ácido.

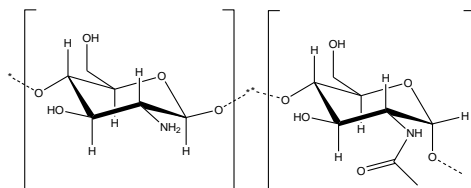


Figura 14: Esquema de la estructura del Quitosano

En disoluciones acuosas con 9×10^{-5} M de Qs (calculada como moles de carga por litro) y 1×10^{-6} M de TPPS se ha observado como a pH menor de 3,8 se produce un desplazamiento de la banda de H₄TPPS²⁻ de 434 a 490 indicando la formación de agregación tipo J favorecido por la interacción con la carga complementaria del polímero. A pH mayores de 3,8 se produce un desplazamiento de la banda de H₂TPPS⁴⁻ a mayores energías de 414 a 400 nm correspondiente al agregado H formado también favorecido por la interacción con la carga complementaria del polímero, como puede observarse en la Figura 15. Por encima de pH 6 no se ha observado agregación puesto que el quitosano deja de ser soluble a partir de ese pH recuperándose así la banda de 414 nm correspondiente a H₂TPPS⁴⁻.

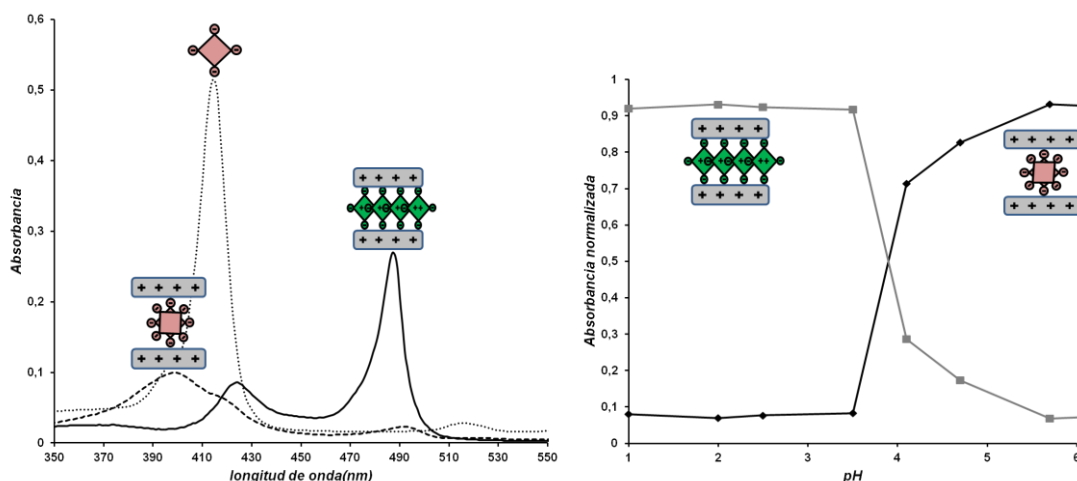


Figura 15: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M y quitosano en concentración 9×10^{-5} M, a pH 8.00 (línea punteada), pH 4.75 (línea discontinua), pH 2.11 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 488 nm (■) y 400 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M y quitosano en concentración 9×10^{-5} M.

3.4. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de PVP

Se ha estudiado como control el comportamiento de TPPS en presencia de PVP pura. Como se puede observar en la Figura 16, se produce un desplazamiento de 7 nm en la banda de H_2TPPS^4 de 414 a 421 nm y un desplazamiento mucho menos notorio de 1 nm para la banda de H_4TPPS^2 de 434 a 435 nm. Además la transición entre estas dos formas monoméricas también cambia y disminuye hasta pH 4.

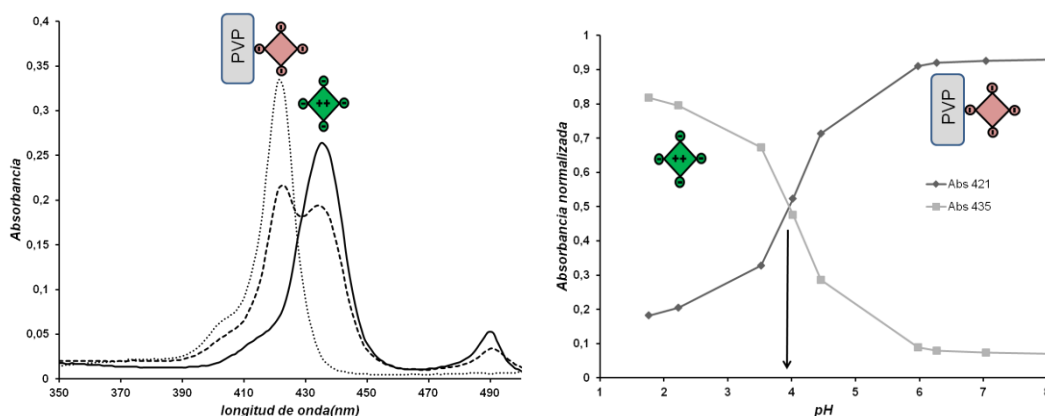


Figura 16: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M y PVP en concentración 9×10^{-5} M, a pH 8.22 (línea punteada), pH 4.02 (línea discontinua), pH 2.23 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 435 nm (■) y 421 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M y PVP en concentración 9×10^{-5} M.

Capítulo 4

Tanto el desplazamiento de la banda a 421 nm como la disminución en una unidad en el pH de transición indican que a pesar de no existir grupos ionizables ni aromáticos, TPPS interacciona con la PVP en su forma tetra-aniónica a pH superior a 4. La interacción de PVP con la H_2TPPS^{-4} no induce agregación a diferencia de lo que ocurría con Qs, donde la interacción electrostática favorecía la agregación del colorante.

Las propiedades surfactantes de la PVP⁴⁸⁻⁵² indican que hay un compromiso entre las propiedades hidrofílicas asociadas al grupo amida e hidrofóbicas asociadas al resto de la cadena hidrocarbonada. Esta anfifilia de la PVP podrían justificar la inesperada interacción con TPPS observada en los desplazamientos de las bandas y el cambio en el pH de transición entre las dos formas monoméricas.

3.5. Propiedades agregativas y ácido-base de la TPPS en presencia de copolímeros poli(VP-co- V_N).

Como se ha descrito en la introducción el objetivo de este trabajo era estudiar la influencia de los copolímeros poli(VP-co- V_N) en los estados de agregación de la TPPS por ser polímeros con grupos aromáticos y cationizables. Sin embargo, el estudio del pK de la amina de la V_N indica que por encima de pH 2 la ionización de la amina es muy baja por lo que por encima de este pH la interacción por efecto de carga estará minimizada.

Se ha estudiado la influencia en la TPPS de los cuatro copolímeros descritos anteriormente con fracciones molares de V_N de 0.1, 0.25, 0.50 y 0.75 así como el homopolímero de V_N .

Al estudiar la influencia de PV_{N-10} en las propiedades agregativas de TPPS se ha observado como el polímero produce un desplazamiento de 9 nm de la banda de H_2TPPS^{-4} a menores energías trasladándose a 423 nm, mientras que el máximo de absorción de H_4TPPS^{-2} se mantiene en 435 nm. El pH de transición entre H_2TPPS^{-4} y H_4TPPS^{-2} disminuye hasta pH 2,1 como puede observarse en la Figura 17.

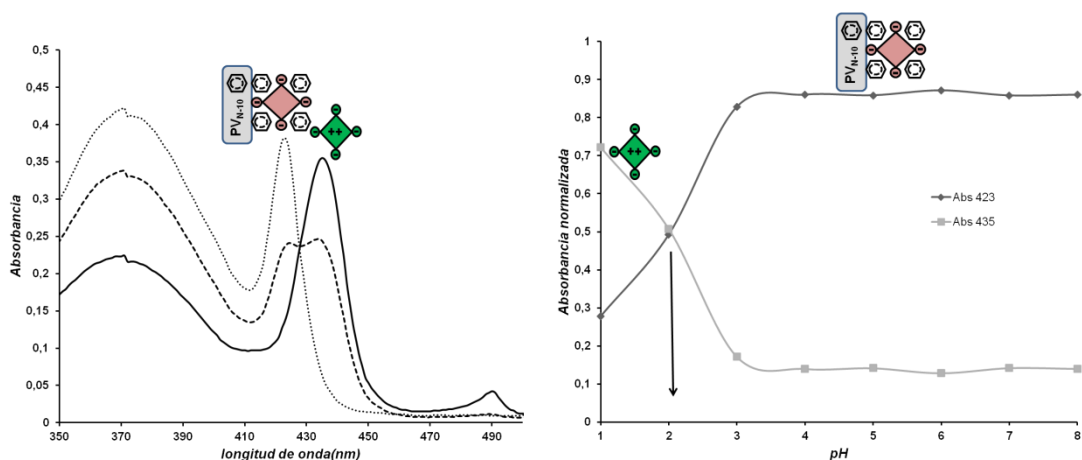


Figura 17: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M y PV_{N-10} en concentración 9×10^{-5} M, a pH 4.81 (línea punteada), pH 2.07 (línea discontinua), pH 1.46 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 435 nm (■) y 423 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M y PV_{N-10} en concentración 9×10^{-5} M.

Tanto la variación del máximo de la banda de H₂TPPS⁴ como del pH de transición son claramente indicativos de una interacción entre esta forma tetra-aniónica y el copolímero PV_{N-10}. Es decir, a pesar de la baja protonabilidad de la unidad V_N, su presencia en tan pequeña cantidad refuerza enormemente el anclaje observado con PVP pura con la forma tetra-aniónica probablemente por interacciones aromáticas. El máximo de absorción y el pK de la amina de los anillos pirrólicos varían debido probablemente a la interacción de la nube aromática de la TPPS con el anillo aromático del polímero que hace que se modifique el entorno electrónico de la amina. Esta misma interacción se ha observado en la mezcla H₂O/DMSO 90:10: mientras que la banda de H₄TPPS² no se modifica con respecto al colorante aislado (a 437 nm), el máximo de la banda de H₂TPPS⁴ se desplaza de nuevo a 423 nm y el pH de transición se desplaza a 2.6 (Figura 18). En los dos medios, al igual que se observó con PVP pura, no hay inducción de agregación del colorante. PV_{N-10} es un polímero con baja densidad aromática que no modifica sustancialmente la estructura de la PVP por lo que probablemente presentará mejores propiedades de biocompatibilidad que polímeros netamente aromáticos.

PV_{N-25}, que en condiciones no ácidas es mucho menos soluble en agua que PV_{N-10}, ha mostrado el mismo tipo de interacción aunque más robusta ya que el pH de transición se desplaza tanto que no es observable, lo cual está de acuerdo con su mayor densidad lineal aromática. En este caso, se observa una única banda en todo el rango de pH correspondiente a la banda de H₂TPPS⁴ que se desplaza de nuevo a 423 nm (Figura 19 izquierda). La interacción es tan fuerte que se estabiliza esta forma en todo el rango de pH.

Se ha observado el mismo comportamiento cuando se modifica el disolvente a la mezcla H₂O/DMSO 90:10 (Figura 19 derecha). En ninguno de los dos medios se induce agregación.

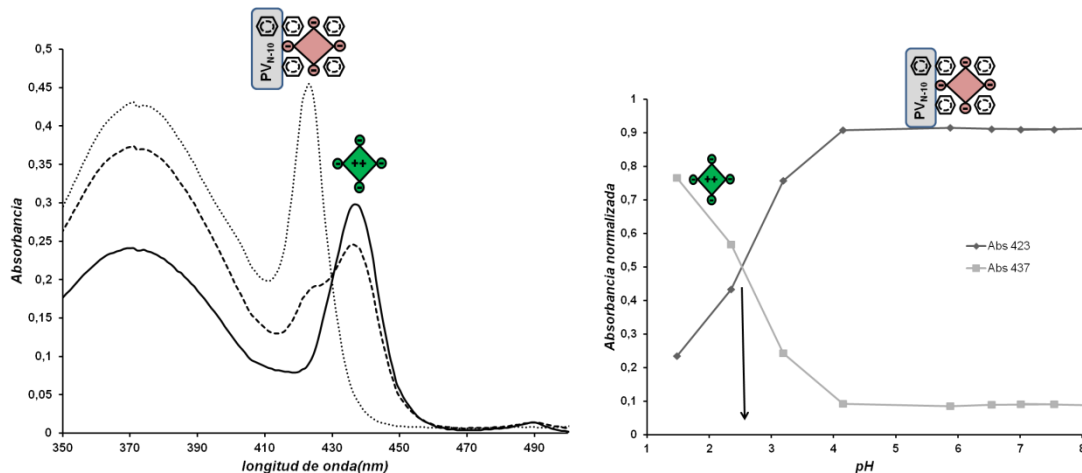


Figura 18: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones en mezclas H₂O/DMSO 90:10 con TPPS en concentración 10⁻⁶ M y PV_{N-10} en concentración 9 x 10⁻⁵ M, a pH 7.55 (línea punteada), pH 2.35 (línea discontinua), pH 1.48 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 437 nm (■) y 423 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10⁻⁶ M y PV_{N-10} en concentración 9 x 10⁻⁵ M.

Los sistemas PV_{N-50}, PV_{N-75} y PV_N no son solubles en agua ni siquiera en condiciones muy ácidas, por lo que solo se ha podido estudiar su influencia en los estados de agregación de TPPS en mezclas H₂O/DMSO 90:10, en las que son perfectamente solubles. Como se ha comentado anteriormente, la baja capacidad de protonación de

Capítulo 4

la amina presente en V_N hace que estos copolímeros portadores de una alta densidad lineal aromática no sean solubles en medios acuosos. En esta mezcla $H_2O/DMSO$ 90:10, en presencia de estos polímeros no se produce ningún desplazamiento de las bandas en comparación con TPPS en ausencia de polímero como puede verse en la Figura 20. Se observa un efecto muy débil en relación al pH de transición entre las dos formas monoméricas, trasladándose de 4,8 a 4,5 en presencia de cualquiera de estos copolímeros.

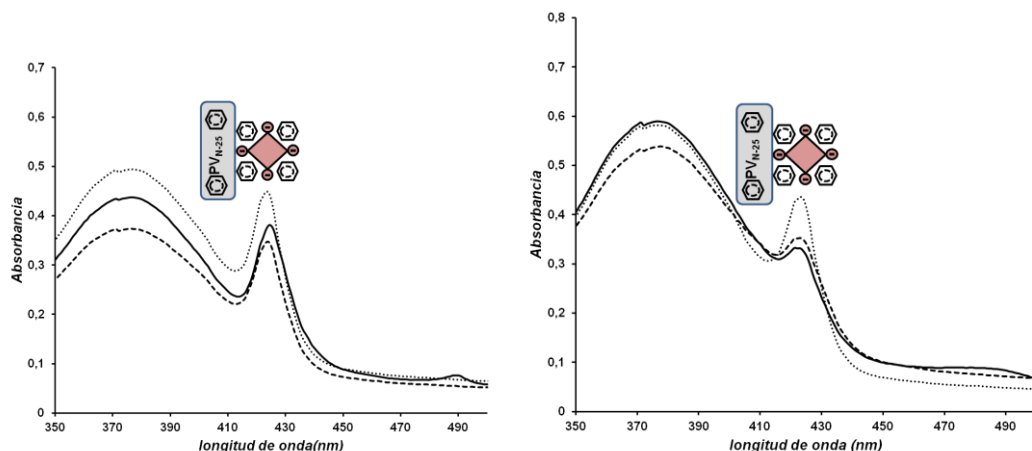


Figura 19: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M y PV_{N-25} en concentración 9×10^{-5} M, a pH 8.40 (línea punteada), pH 4.83 (línea discontinua), pH 1.43 (línea continua). Derecha: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones en mezclas $H_2O/DMSO$ 90:10 con TPPS en concentración 10^{-6} M y PV_{N-25} en concentración 9×10^{-5} M, a pH 8.16 (línea punteada), pH 3.38 (línea discontinua), pH 1.54 (línea continua).

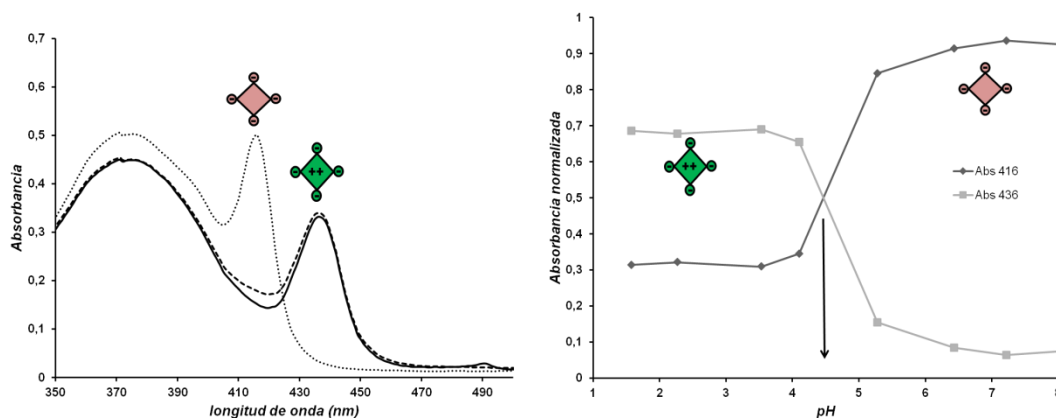


Figura 20: Izquierda: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones en mezclas $H_2O/DMSO$ 90:10 con TPPS en concentración 10^{-6} M y PV_{N-50} en concentración 9×10^{-5} M, a pH 7.22 (línea punteada), pH 4.10 (línea discontinua), pH 1.58 (línea continua). Derecha: Absorbancia normalizada a 436 nm (■) y 416 nm (◆) en función del pH para disoluciones acuosas de TPPS a 10^{-6} M y PV_{N-50} en concentración 9×10^{-5} M. Esta figura muestra como ejemplo los resultados de PV_{N-50} , para PV_{N-75} y PV_N el resultado fue idéntico.

Estos resultados indican que sorprendentemente no hay interacción entre la TPPS y estos polímeros, a pesar de tener mayor carga de amina aromática que PV_{N-10} y PV_{N-25}. Este hecho, junto con la interacción observada en el caso de la PVP pura, parece indicar que es necesario un cierto balance anfílico de unidades VP y V_N para que se produzca la interacción y el anclaje. Dado que se sabe que otros polímeros netamente aromáticos cargados son capaces de estabilizar esta interacción, los resultados obtenidos en este estudio se podrían explicar por la baja protonabilidad de la amina aromática del copolímero y por tanto por su incapacidad de estabilizar electroestáticamente la interacción aromática entre el colorante y V_N, que es la interacción principal. Por ello, es necesario un entorno hidrofílico extra (es decir unidades VP) capaz de proporcionar dicha estabilización hidrofílica. Copolímeros con mucha carga aromática (50% molar o más) no presentan el balance anfílico apropiado para estabilizar la interacción, como si la alta densidad aromática apantallase las interacciones con los restos hidrofílicos de VP que parecen ser necesarias. Este comportamiento está de acuerdo con la conocida capacidad surfactante y estabilizante de la propia PVP^{51,53-54}, y de alguna manera ofrece un nuevo enfoque a la temática estudiada aquí de interacción de colorantes aromáticos cargados, pues se ha mostrado que la estabilización o la interacción pueden llevarse a cabo mediante vías alternativas a la interacción con cargas aromáticas complementarias.

A continuación, en la Tabla 2, se muestran a modo de resumen los resultados expuesto anteriormente para los distintos copolímeros a estudio respecto a su interacción con TPPS y al pH de transición entre la forma tetra-aniónica y di-aniónica.

Tabla 2: $\lambda_{\text{máx.}}$ de las formas monoméricas H₂TPPS⁴⁻ y H₄TPPS²⁻ y su correspondiente pH de transición para los diferente copolímeros y disolventes estudiados.

Poliectrolito	Disolvente	$\lambda_{\text{máx.}}$ monómero	$\lambda_{\text{máx.}}$ monómero	pH de transición
		H ₂ TPPS ⁴⁻ (nm)	H ₄ TPPS ²⁻ (nm)	H ₄ TPPS ²⁻ - H ₂ TPPS ⁴⁻
ninguno	H ₂ O	414	434	4.9
ninguno	H ₂ O:DMSO 90:10	416	437	4.8
PVP	H ₂ O	421	435	4.0
PV _{N-10}	H ₂ O	423	435	2.1
PV _{N-10}	H ₂ O:DMSO 90:10	423	437	2.6
PV _{N-25}	H ₂ O	423	-	-
PV _{N-25}	H ₂ O:DMSO 90:10	423	-	-
PV _{N-50}	H ₂ O:DMSO 90:10	416	437	4.5
PV _{N-75}	H ₂ O:DMSO 90:10	416	437	4.5
PV _N	H ₂ O:DMSO 90:10	416	437	4.5

3.6. Formación de agregados polímero-colorante

Los estudios de interacciones se han monitorizado por DLS para observar la posible formación de agregados polímero-colorante. En ninguno de los ensayos en agua se ha observado agregación y en las mezclas H₂O/DMSO 90:10 tan solo se ha observado agregación en el caso de PV_{N-25}.

Se ha analizado la formación de agregados polímero-colorante en este polímero en disolución en H₂O/DMSO 90:10 fijando la concentración de polímero en 9×10^{-5} M y variando la concentración de TPPS de 3×10^{-7} M a 9×10^{-6} M a pH 3,5. Al analizar por DLS el tamaño y el potencial de los agregados obtenidos con las distintas relaciones PV_{N-25}/TPPS con cantidades crecientes de TPPS se observa la variación representada en la Figura 21.

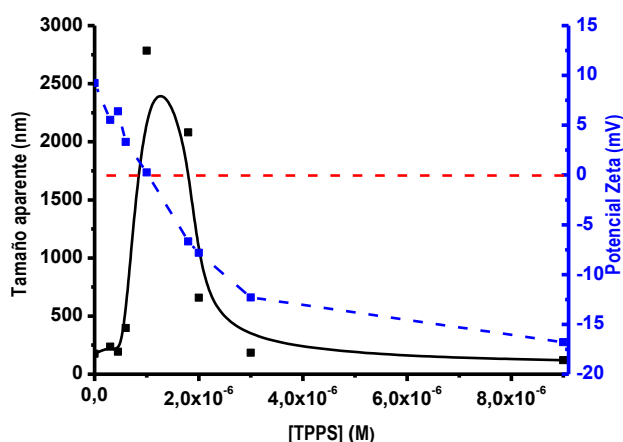


Figura 21: Tamaño aparente (nm) (eje izquierdo, negro) y potencial zeta (eje derecho, azul) de los precipitados con PV_{N-25} (9×10^{-5} M) en función de la relación de la concentración de TPPS. La línea discontinua roja marca el potencial zeta 0 mV.

PV_{N-25} forma nanoagregados en la mezcla de disolventes H₂O/DMSO 90:10 incluso en ausencia de TPPS con un tamaño aparente de 175 nm y un potencial zeta positivo (9.23 mV). El potencial zeta no es muy alto debido probablemente a la ionización parcial de la amina de las unidades V_N. Al introducir la TPPS y aumentar su concentración se forman agregados polímero-colorante que aumentan de tamaño por la posible formación de complejos de carga entre el porcentaje de amina que esté protonada y el cromóforo; el potencial disminuye lentamente. Existe un máximo en el tamaño aparente en torno a la concentración de 1×10^{-6} M de TPPS. Este máximo se correlaciona con el cambio en el signo del potencial zeta, es decir, cuando se produce una cancelación de cargas entre el polímero y la TPPS. Al incrementar la concentración de TPPS por encima de este máximo el tamaño aparente disminuye puesto que los agregados polímero-colorante tienen una carga neta negativa que hace que se repelan.

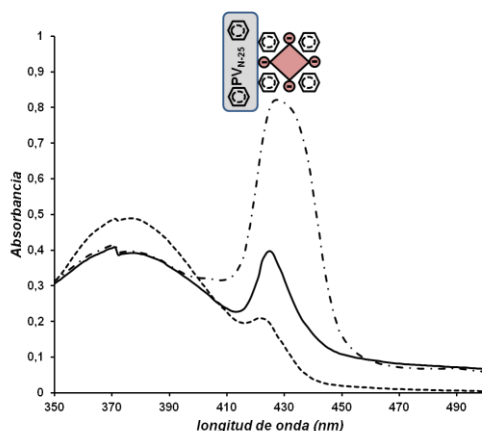


Figura 22: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones de PV_{N-25} en concentración 9×10^{-5} M en mezclas H₂O/DMSO 90:10, con TPPS en concentración 3×10^{-6} M (línea discontinua), 1×10^{-6} M (línea continua), 6×10^{-7} M (línea punteada).

En la Figura 22, se muestra como a las concentraciones estudiadas PV_{N-25} sigue manteniendo la interacción con la TPPS.

Estos agregados polímero-colorante podrían ser interesantes para incluirlos en formulaciones farmacéuticas dependiendo de la ruta de administración.

3.7. Fortaleza de la interacción con los polímeros (VP-co-V_N)

Se ha evaluado la fortaleza de la interacción de los polímeros (VP-co-V_N) con la TPPS frente al efecto de agregación que provocan polielectrolitos como el Qs. Para ello se ha establecido una competición entre Qs y PV_{N-10} (Figura 23). Se ha elegido PV_{N-10} por ser el más soluble en agua.

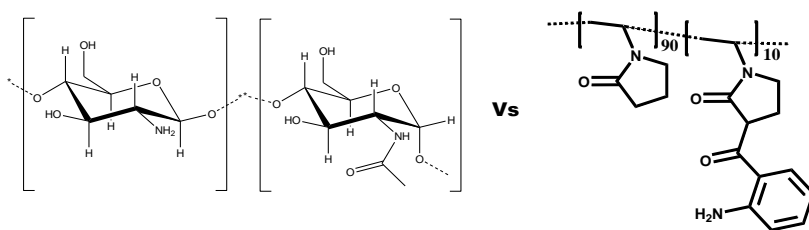


Figura 23: Estructuras de los dos polímeros en competencia Qs y PV_{N-10}

Para el estudio se han preparado disoluciones de TPPS (1×10^{-6} M) a pH 5 en presencia de mezclas QS y PV_{N-10}. En estos experimentos la concentración total de grupos funcionales en los polímeros se ha fijado en 9×10^{-5} M y las concentraciones de carga relativas de Qs y PV_{N-10} se fueron variando desde 100% Qs a 100% PV_{N-10}. En la Figura 24 se observa como en presencia de 100% Qs la TPPS forma agregados H (línea continua), como se ha visto anteriormente, y como esta agregación se ve inhibida ya en una relación PV_{N-10}/Qs (10:90), es decir, con 9 veces más de Qs que de PV_{N-10}. Al aumentar la relación PV_{N-10}/Qs la interacción con PV_{N-10} se mantiene.

Capítulo 4

Este resultado muestra como la interacción del colorante con PV_{N-10} es mucho más intensa que con Qs puesto que tan solo con un 10% de cargas de PV_{N-10} frente a un 90% de cargas de Qs la TPPS interacciona con PV_{N-10} manteniéndose en su forma tetra-aniónica inhibiendo de esta forma la agregación favorecida por las interacciones electroestáticas con el Qs.

La fortaleza de la interacción entre TPPS y PV_{N-10} , podría ser relevante en aplicaciones biológicas donde se pueden encontrar diferentes estructuras con distinta carga superficial o lineal, con potencial influencia en el estado de agregación del colorante y por lo tanto en su respuesta a la luz

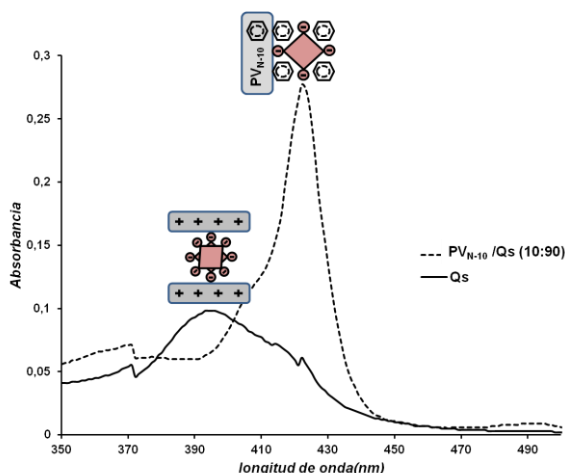


Figura 24: Absorbancia en función de la longitud de onda para disoluciones acuosas con TPPS en concentración 10^{-6} M y polímero en concentración 9×10^{-5} M, Qs (línea continua) y PV_{N-10}/Qs (10/90) (línea discontinua).

4- Conclusiones:

La ruta bottom up planteada en la tesis permite sintetizar PVP funcionalizada con aminas aromáticas con control de carga manteniendo la estructura del esqueleto de la PVP y consiguiendo una funcionalización homogénea al copolimerizar VP con V_N (sintetizado en el capítulo 1). Los copolímeros poli(VP-co- V_N) presentan en su estructura aminas aromáticas que han resultado ser difícilmente cationizables dado el alto pK_b de la amina.

Los resultados obtenidos en la interacción de los copolímeros con TPPS parecen indicar que, para conseguir un anclaje eficiente, es necesario balancear las propiedades anfífilas de las unidades VP con la interacción aromática de las unidades V_N siendo PV_{N-25} el que consigue un mejor balance. Debido a la baja capacidad de protonación de la amina, la estabilización de la interacción aromática en este caso debe atribuirse a la interacción polar con la VP y no a interacciones electrostáticas como ocurre en otros sistemas aromáticos cargados descritos en la literatura.

Las interacciones de estos copolímeros con TPPS evitan su agregación incluso en presencia de competidores cargados con demostrados efectos agregativos como quitosano.

Influencia de Poli(VP-co-V_N) en los estados de agregación de TPPS

Con el polímero PV_{N-25} se ha observado una formación de agregados entre nano y micrométricos polímero-colorante.

Por tanto, se han obtenido resultados prometedores de cara a su posible utilidad en terapia fotodinámica.

5- Bibliografía:

- 1 Macdonald, I. J. & THOMAS, J. D. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **5**, 105-129 (2001).
- 2 Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N. & Reed, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochemistry and photobiology* **74**, 656-669 (2001).
- 3 Usuda, J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *Journal of Thoracic Oncology* **1**, 489-493 (2006).
- 4 Dahl, T. A. DIRECT EXPOSURE OF MAMMALIAN CELLS TO PURE EXOGENOUS SINGLET OXYGEN (AgO_2). *Photochemistry and photobiology* **57**, 248-254 (1993).
- 5 Braun, A. M., Maurette, M. T. & Oliveros, E. *Photochemical technology*. (Wiley Chichester, 1991).
- 6 Wilkinson, F., Helman, W. P. & Ross, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of physical and chemical reference data* **22**, 113-113 (1993).
- 7 Weishaupt, K. R., Gomer, C. J. & Dougherty, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer research* **36**, 2326-2329 (1976).
- 8 Doiron, D. R. & Gomer, C. J. *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors: Proceedings of the Clayton Foundation International Symposium on Porphyrin Localization and Treatment of Tumors, Santa Barbara, California, April 24-28, 1983*. Vol. 170 (Liss, 1984).
- 9 Bonnett, R. & Martínez, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **57**, 9513-9547 (2001).
- 10 Wainwright, M. Non-Porphyrin Photosensitizers in Biomedicine. *ChemInform* **28**, no-no (1997).
- 11 Dougherty, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 889-905 (1998).
- 12 Consumer, F. Photofrin to treat precancerous lesions in Barrett's esophagus. *FDA Consumer* **37**, 4 (2003).
- 13 Evans, H. H., Horng, M. F., Ricanati, M., Deahl, J. T. & Oleinick, N. L. Mutagenicity of photodynamic therapy as compared to UVC and ionizing radiation in human and murine lymphoblast cell lines. *Photochemistry and photobiology* **66**, 690-696 (2008).
- 14 Van Der Auweraer, M., Verschuere, B. & De Schryver, F. C. Absorption and fluorescence properties of rhodamine B derivatives forming Langmuir-Blodgett films. *Langmuir* **4**, 583-588 (1988).
- 15 Tsukanova, V., Lavoie, H., Harata, A., Ogawa, T. & Salesse, C. Microscopic organization of long-chain rhodamine molecules in monolayers at the air/water interface. *Journal of Physical Chemistry B* **106**, 4203-4213 (2002).
- 16 Kasha, M., Rawls, H. & El-Bayoumi, M. A. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem* **11**, 371-392 (1965).

- 17 Kemnitz, K., Tamai, N., Yamazaki, I., Nakashima, N. & Yoshihara, K. Fluorescence decays and spectral properties of rhodamine B in submono-, mono-, and multilayer systems. *The Journal of Physical Chemistry* **90**, 5094-5101 (1986).
- 18 Martínez, V. M., Arbeloa, F. L., Prieto, J. B., López, T. A. & Arbeloa, I. L. Characterization of Rhodamine 6G aggregates intercalated in solid thin films of Laponite clay. 1. Absorption spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **108**, 20030-20037 (2004).
- 19 Manning, G. S. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. 8. Mixtures of counterions, species selectivity, and valence selectivity. *Journal of Physical Chemistry* **88**, 6654-6661 (1984).
- 20 Nordmeier, E. Advances in polyelectrolyte research: counterion binding phenomena, dynamic processes, and the helix-coil transition of DNA. *Macromolecular Chemistry and Physics* **196**, 1321-1374 (1995).
- 21 López Arbeloa, F., Aguirresacona, I. U. & Arbeloa, I. L. Influence of the molecular structure and the nature of the solvent on the absorption and fluorescence characteristics of rhodamines. *Chemical physics* **130**, 371-378 (1989).
- 22 López Arbeloa, F., Ruiz Ojeda, P. & López Arbeloa, I. Dimerization and trimerization of rhodamine 6G in aqueous solution. Effect on the fluorescence quantum yield. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* **84**, 1903-1912 (1988).
- 23 Rabinowitch, E. & Epstein, L. F. Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue1. *Journal of the American Chemical Society* **63**, 69-78 (1941).
- 24 Schwab, A. D. *et al.* Photoconductivity of self-assembled porphyrin nanorods. *Nano Letters* **4**, 1261-1265 (2004).
- 25 De Greef, T. F. A. & Meijer, E. W. Materials science: Supramolecular polymers. *Nature* **453**, 171-173 (2008).
- 26 De Greef, T. F. A. *et al.* Supramolecular polymerization. *Chemical Reviews* **109**, 5687-5754 (2009).
- 27 Horn, D. Optisches Zweistrahlverfahren zur Bestimmung von Polyelektrolyten in Wasser und zur Messung der Polymeradsorption an Grenzflächen. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 251-264 (1978).
- 28 Schwarz, G., Klose, S. & Balthasar, W. Cooperative binding to linear biopolymers. 2. Thermodynamic analysis of the proflavine-poly (L-glutamic acid) system. *European journal of biochemistry/FEBS* **12**, 454 (1970).
- 29 Maiti, N. C., Mazumdar, S. & Periasamy, N. J- and H-aggregates of porphyrins with surfactants: Fluorescence, stopped flow and electron microscopy studies. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2**, 369-376 (1998).
- 30 Moreno-Villoslada, I., Flores, M. E., Marambio, O. G., Pizarro, G. D. C. & Nishide, H. Polyaromatic-Anion Behavior of Different Polyelectrolytes Containing Benzenecarboxylate Units. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 7753-7759 (2010).
- 31 Moreno-Villoslada, I. *et al.* Comparative study of the self-aggregation of rhodamine 6G in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate), Poly(N -phenylmaleimide- co -acrylic acid), poly(styrene- alt -maleic acid), and poly(sodium acrylate). *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 11983-11992 (2010).

Capítulo 4

- 32 Moreno-Villoslada, I. *et al.* Control of C.I. Basic Violet 10 aggregation in aqueous solution by the use of poly(sodium 4-styrenesulfonate). *Dyes and Pigments* **82**, 401-408 (2009).
- 33 Moreno-Villoslada, I. *et al.* Complex formation between rhodamine B and poly(sodium 4-styrenesulfonate) studied by $^1\text{H-NMR}$. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 21576-21581 (2006).
- 34 Moreno-Villoslada, I. *et al.* π -Stacking of rhodamine B onto water-soluble polymers containing aromatic groups. *Polymer* **47**, 6496-6500 (2006).
- 35 Moreno-Villoslada, I. *et al.* PH dependence of the interaction between rhodamine B and the water-soluble poly(sodium 4-styrenesulfonate). *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 11809-11812 (2006).
- 36 Moreno-Villoslada, I., Torres, C., González, F., Shibue, T. & Nishide, H. Binding of methylene blue to polyelectrolytes containing sulfonate groups. *Macromolecular Chemistry and Physics* **210**, 1167-1175 (2009).
- 37 Moreno-Villoslada, I., Torres-Gallegos, C., Araya-Hermosilla, R. & Nishide, H. Influence of the linear aromatic density on methylene blue aggregation around polyanions containing sulfonate groups. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 4151-4158 (2010).
- 38 Ribó, J. M., Crusats, J., Sagués, F., Claret, J. & Rubires, R. Chiral sign induction by vortices during the formation of mesophases in stirred solutions. *Science* **292**, 2063-2066 (2001).
- 39 Schwab, A. D. *et al.* Porphyrin nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* **107**, 11339-11345 (2003).
- 40 Kadish, K. M., Maiya, G. B., Araullo, C. & Guillard, R. Micellar effects on the aggregation of tetraanionic porphyrins. Spectroscopic characterization of free-base meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)H₂, and (TPPS)M (M = Zn(II), Cu(II), VO₂⁺) in aqueous micellar media. *Inorganic chemistry* **28**, 2725-2731 (1989).
- 41 Kalyanasundaram, K. & Neumann-Spallart, M. Photophysical and redox properties of water-soluble porphyrins in aqueous media. *Journal of Physical Chemistry* **86**, 5163-5169 (1982).
- 42 Moreno-Villoslada, I., Murakami, T. & Nishide, H. Comment on "J- and H-Aggregates of 5, 10, 15, 20-Tetrakis-(4- sulfonatophenyl)-porphyrin and Interconversion in PEG-b-P4VP Micelles". *Biomacromolecules* **10**, 3341-3342 (2009).
- 43 Rubires, R. *et al.* Self-assembly in water of the sodium salts of meso-sulfonatophenyl substituted porphyrins. *New Journal of Chemistry* **23**, 189-198 (1999).
- 44 Zhao, L. *et al.* J- and H-aggregates of 5,10,15,20-tetrakis-(4-sulfonatophenyl)-porphyrin and interconversion in PEG-b-P4VP micelles. *Biomacromolecules* **9**, 2601-2608 (2008).
- 45 Zhao, L. *et al.* Reply to comment on "J- and H-aggregates of 5,10,15,20-tetrakis-(4- sulfonatophenyl)-porphyrin and interconversion in PEG-b-P4VP micelles". *Biomacromolecules* **10**, 3343-3344 (2009).
- 46 Egawa, Y., Hayashida, R. & Anzai, J. I. PH-induced interconversion between J-aggregates and H-aggregates of 5,10,15,20-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin in polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir* **23**, 13146-13150 (2007).

- 47 Sugihara, Y., O'Connor, P., Zetterlund, P. B. & Aldabbagh, F. Chain transfer to solvent in the radical polymerization of N-isopropylacrylamide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **49**, 1856-1864 (2011).
- 48 Ishii, N. & Inoue, K. Synthesis and regular reflection property of cocoon-like poly (methyl methacrylate) particles by seeded suspension polymerization. *Polymer bulletin* **63**, 653-662 (2009).
- 49 Karagoz, B., Gunes, D. & Bicak, N. Preparation of Crosslinked Poly (2-bromoethyl methacrylate) Microspheres and Decoration of Their Surfaces with Functional Polymer Brushes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**, 1999-2007 (2010).
- 50 Zhang, H. T., Yuan, X. Y. & Huang, J. X. Study of kinetics and nucleation mechanism of dispersion copolymerization of methyl methacrylate and acrylic acid. *Reactive and functional polymers* **59**, 23-31 (2004).
- 51 Sairam, M., Ramesh Babu, V., Krishna Rao, K. & Aminabhavi, T. Poly (methylmethacrylate)-poly (vinyl pyrrolidone) microspheres as drug delivery systems: Indomethacin/cefadroxil loading and in vitro release study. *Journal of Applied Polymer Science* **104**, 1860-1865 (2007).
- 52 Minami, H., Yoshida, K. & Okubo, M. Preparation of polystyrene particles by dispersion polymerization in an ionic liquid. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 567-572 (2008).
- 53 Feng, M. & Li, P. Amine-containing core-shell nanoparticles as potential drug carriers for intracellular delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80**, 184-193 (2007).
- 54 Changerath, R., Nair, P. D., Mathew, S. & Nair, C. Poly (methyl methacrylate)-grafted chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **89**, 65-76 (2009).

Capítulo 5

Funcionalización selectiva de sistemas dispersos de poli (MMA-co-VP) precursores de partículas

1- Introducción:

Como se ha descrito tanto en la introducción general de la tesis como en el capítulo dos, la copolimerización de VP con metacrilatos conduce a sistemas altamente heterogéneos dada la baja activación de la VP. Esta heterogeneidad es, como se ha expuesto, una desventaja para obtener PVP funcionalizada usando metacrilatos como comonómero activo. Sin embargo, puede ser una oportunidad muy interesante cuando el objetivo es preparar materiales anfífilos puesto que como se describió en el capítulo dos en la copolimerización de dos monómeros con alta reactividad diferencial se forman dos especies principales en una única reacción. En trabajos anteriores de nuestro grupo¹ se describe como la polimerización radical convencional de metacrilato de metilo (MMA) y vinilpirrolidona (VP) en metanol a alta conversión conduce a una alta heterogeneidad composicional. Esta heterogeneidad genera en medios alcohólicos un inusual comportamiento de separación de fases con reparto de las cadenas copoliméricas entre las dos fases en función de su composición. La fase dispersa es rica en copolímeros comparativamente más hidrofóbicos (cadenas ricas en MMA) mientras que la fase continua es rica en copolímeros comparativamente más hidrofílicos (cadenas ricas en VP).

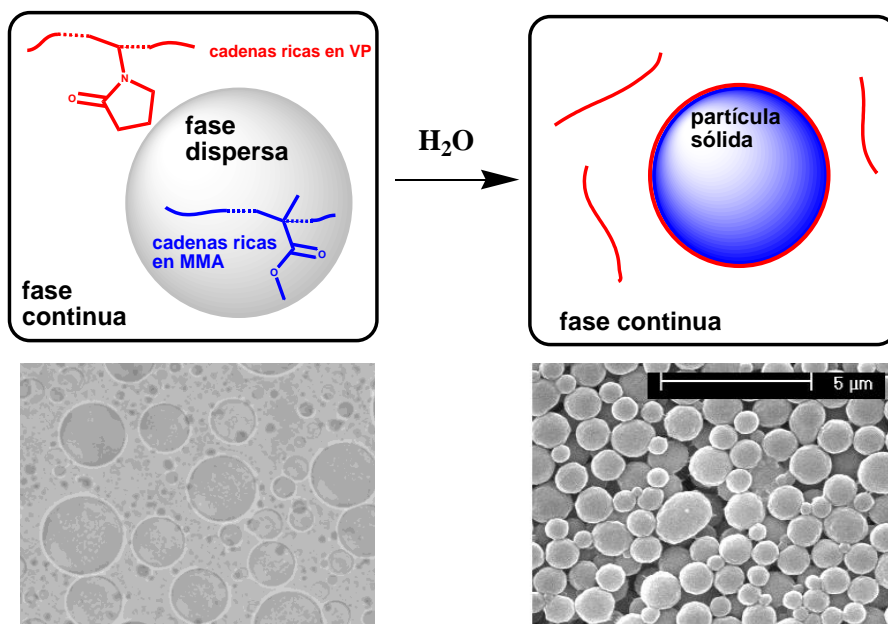


Figura 1: (Arriba) Esquema representativo de los tipos de cadenas y su localización en el sistema disperso. (Abajo izquierda): Micrografía óptica de una emulsión real obtenida tras la copolimerización radical de MMA y VP en metanol. (Abajo derecha): Micrografía SEM de microesferas sólidas obtenidas por adición de agua a la emulsión previa.

Esta separación de fases se produce debido al fenómeno de 'upper critical solution temperature' (UCST) que presentan los copolímeros ricos en MMA en metanol. El homopolímero PMMA muestra una UCST en metanol en torno a 87°C². Por debajo de la UCST, la interacción polímero-solvente no favorece la solubilidad de las cadenas con más MMA y se forma una fase rica en estas cadenas, es decir, se produce la separación de fases. La Figura 1 (izquierda) muestra una emulsión típica obtenida por la agitación de una copolimerización equimolar entre MMA y VP.

Capítulo 5

La adición de agua a este sistema emulsificado da lugar a microesferas sólidas basadas en MMA (Figura 1 derecha) y estabilizadas por las cadenas ricas en VP en un proceso que podemos considerar ‘autoestabilizante’ (no hay necesidad de surfactante extra)¹. Este proceso y su simplicidad son interesantes porque MMA y VP son monómeros precursores típicos de núcleo sólido y surfactante polimérico respectivamente³⁻⁵. Las partículas de PMMA normalmente se preparan por distintos procesos de polimerización heterogénea como la polimerización en dispersión⁶⁻⁷, suspensión³ o emulsión⁸⁻⁹. Estas partículas de PMMA tienen interés tecnológico (baterías de litio, plásticos espumables, películas superhidrofóbicas, acumuladores de energía térmica...) ¹⁰⁻¹² y biomédico (cementos óseos, liberación de fármacos, vacunas...) ¹³⁻¹⁷ ya que son consideradas biocompatibles¹³. A excepción de algunas técnicas específicas como la polimerización en emulsión sin surfactante¹⁸, estos métodos requieren moléculas surfactantes para estabilizar las partículas de PMMA formadas en la polimerización. Polímeros anfífilicos como la PVP^{3-5,19} y otros^{7,20} son surfactantes típicos en estas aplicaciones. PVP es también un surfactante común para estabilizar partículas de poliestireno²¹.

El proceso descrito en la Figura 1, además de su simplicidad y de su carácter ‘autoestabilizante’, tiene el interés de que se incrementa (y se modula) la hidrofilia de las partículas basadas en MMA, debido a la adición de unidades VP. La propia PVP ha resultado de utilidad en este aspecto al recubrir las partículas de PMMA^{19,22-23} en un intento de mejorar la incompleta liberación de fármacos que muestran estas partículas debido a la naturaleza hidrofóbica del polímero. Alternativamente otros grupos han tratado de mejorar la hidrofilia de las partículas de PMMA funcionalizándolas con grupos carboxílicos²⁴⁻²⁶.

Volviendo a la Figura 1, el carácter heterogéneo de la copolimerización de MMA y VP y el singular reparto de cadenas en las dos fases metanólicas en función de su composición puede verse como una oportunidad para la funcionalización selectiva de las fases, mediante la adición de una pequeña cantidad de monómero funcionalizado con un grupo polimerizable homólogo, es decir, derivados metacrílicos o vinílicos (ver Figura 2). El empleo de comonómeros homólogos es adecuado para funcionalizar estos dos tipos de cadenas puesto que, VP y las VP derivadas son monómeros poco activados y por lo tanto durante la copolimerización los radicales en crecimiento de las cadenas son mucho más reactivos hacia los metacrilatos como se ha mencionado anteriormente, y por ello durante la copolimerización los radicales en crecimiento de las cadenas son mucho más reactivos hacia los metacrilatos.

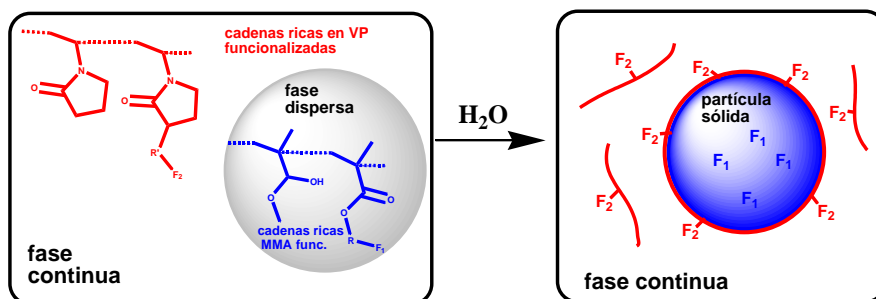


Figura 2: Esquemas representativo de la hipótesis de funcionalización selectiva de las cadenas y las fases

La hipótesis es que tanto la fase dispersa como la continua de la emulsión en metanol puede ser funcionalizada de manera bastante selectiva únicamente añadiendo un tercer comonómero a la copolimerización.

Este tercer comonómero debe ser añadido en pequeña proporción para tener baja influencia en el fenómeno de separación de fases. La funcionalización de cada una de las fases de la emulsión podría trasladarse a los distintos componentes de las esferas sólidas en agua, es decir, una funcionalización parcial en VP podría implicar una funcionalización del surfactante polimérico y por lo tanto de la superficie, mientras que una funcionalización parcial de la parte metacrílica podría significar una funcionalización del componente del núcleo de la partícula. Se muestra un esquema representativo en la Figura 2.

En este trabajo se analiza la hipótesis de funcionalización selectiva de las fases incorporando una pequeña cantidad (0.5 % molar) de diferentes comonómeros funcionalizados con grupos anionizables sulfonato y carboxílico mostrados en la Figura 3.

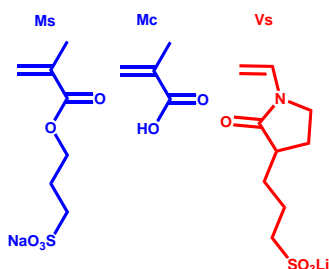


Figura 3: Estructura de los comonómeros añadidos al 0.5% molar a las copolimerizaciones equimolares de MMA y VP en metanol.

Esta funcionalización selectiva se analiza estudiando el comportamiento de nanopartículas magnéticas (mNPs) portadoras de carga complementaria positiva superficial (partículas de Fe₃O₄ estabilizadas con hidróxido de tetrametilamonio) cuando son añadidas a la emulsión bifásica. La pequeña cantidad de monómero modificado, 0,5% molar, fue elegida por ser suficientemente baja para tener un efecto débil en el fenómeno de UCST pero suficientemente alta para tener significancia química.

En un siguiente paso se ha estudiado el proceso de formación de micro y nano-esferas sólidas basadas en MMA obtenidas como se ha mencionado anteriormente, mediante adición de agua gota a gota a las emulsiones que contienen mNPs. Estos estudios son de interés pues la comprensión de los fenómenos responsables de la interacción de las mNPs con sistemas dispersos como emulsiones líquido-líquido o suspensiones sólido-líquido puede permitir la preparación de nuevos materiales que aprovechan estas interacciones²⁷⁻²⁸. Los sistemas coloidales pueden estabilizar emulsiones líquido-líquido (las denominadas emulsiones pickering)²⁹ y los autoensamblajes en interfases³⁰, etc. Esta interacción interfase/nanopartícula es fuertemente dependiente de las características químicas de la interfase, que puede ser modulada, por ejemplo, controlando la naturaleza del surfactante³¹, variando el pH o la fuerza iónica del medio (en el caso de emulsiones agua/aceite)³²⁻³³, o aprovechando las interacciones coulombimétricas de determinados polielectrolitos cuando se añaden a látex de poliestireno³⁴. En el caso de mNPs, la preparación de distintos materiales compuestos con nanopartículas localizadas en el núcleo o la superficie de entidades poliméricas sólidas se ha estudiado en los últimos años: por un lado partículas poliméricas recubiertas con material magnético pueden ser de interés como perlas activas en diferentes campos³⁵. Por otro lado, la encapsulación de mNPs en matrices poliméricas modula la toxicidad, estabilidad y compatibilidad de este tipo de materiales³⁶⁻³⁷. Puesto que las mNPs han sido propuestas como

Capítulo 5

nanocalentadores para aplicaciones biomédicas, su encapsulación en dispositivos poliméricos podría emplearse en medicina para combinar este efecto de hipertermia con otros propósitos complementarios en liberación de fármacos³⁸.

La funcionalización de la superficie de las partículas tiene obviamente interés 'per se', no solo como vía para preparar partículas portadoras de mNPs en la superficie. Este tipo de funcionalización requiere, de acuerdo a la hipótesis propuesta, de la adición de VP funcionalizada como tercer monómero para modificar la superficie estabilizadora de la partícula. Por ello, en este capítulo se ha incluido una descripción de la preparación y caracterización de micro y nano-esferas 'autoestabilizadas' basadas en MMA y funcionalizadas superficialmente con grupos sulfonato y carboxilato mediante la adición en la polimerización de diferentes cantidades de VPs funcionalizadas. Estos dos sistemas incorporarían grupos funcionales accesibles superficialmente (que podrían ser usados para diferentes conjugaciones posteriores) y también aumentarían la hidrofilia superficial de las partículas, un aspecto de interés como se ha mencionado anteriormente.

2- Experimental:

2.1. Reactivos:

El metacrilato de metilo (MMA), el ácido metacrílico (Mc) y la vinilpirrolidona (VP), todos ellos de Aldrich, se destilaron a presión reducida y se conservaron a -20°C (MMA y Mc) y 4°C (VP). El sulfopropil metacrilato de sodio (Ms, Aldrich) se empleó sin purificación extra. El azobisisobutironitrilo (AIBN, Aldrich) se recrystalizó en etanol. La sulfopropilvinilpirrolidona (Vs) se sintetizó como se describe en el capítulo uno y la carboxilvinilpirrolidona (Vc) se sintetizó como describen Bencini *et al* ³⁹. El resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

2.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) mNPs

Las nanopartículas magnéticas fueron proporcionadas y caracterizadas por el grupo del Prof. Erhan Piskin, Hacettepe University, Ankara, Turquía. La descripción de la producción y caracterización de las nanopartículas magnéticas se detalla en publicaciones anteriores ^{36,40} por lo que se describe brevemente. En un reactor que contiene 160 mL de agua destilada a 80°C bajo atmósfera de nitrógeno y mezcla vigorosa se añadieron 120 mL de una disolución acuosa de sales de Fe²⁺ y Fe³⁺ (1.25 M total) y 120 mL de una solución de NaOH 5 M. En las primeras etapas de la reacción se formó un precipitado negro, se mantuvo en agitación a 3000 rpm y 80°C durante 2 horas. Se estabilizaron las partículas magnéticas por una lenta adición de 10 mL de hidróxido de tetrametilamonio al 25% (w/w).

La remanencia (capacidad de un material para retener el magnetismo que le ha sido inducido) de las partículas fue igual a cero y la coercitividad (intensidad del campo magnético que se debe aplicar a un material para reducir su magnetización a cero después de que la muestra ha sido magnetizada hasta saturación) es prácticamente despreciable en ausencia de un campo magnético externo. La saturación de magnetización fue 6.6 emu/g a un campo magnético de 1.24 T. Las nanopartículas se transfirieron de agua destilada a un volumen equivalente de metanol por diálisis empleando membranas de cut-off 3500. Esta solución en metanol fue la empleada en el estudio.

2.3. Copolimerización

Las copolimerizaciones se realizaron bajo agitación magnética por polimerización radical convencional en metanol a 60°C durante 48 horas empleando AIBN como iniciador. Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de oxígeno al burbujear nitrógeno durante 30 minutos antes de sellar el sistema. La concentración total de monómero e iniciador fue 1 y 0.015 mol/L respectivamente. Las composiciones iniciales en alimentación, expresadas en fracciones molares, se muestran en las tablas 1 y 2.

2.4. Emulsiones líquido/líquido y esferas sólidas

Las gotas de la emulsión obtenida se endurecieron por adición de agua gota a gota bajo agitación dando como resultado las partículas sólidas. Las partículas se recuperaron por centrifugación (microfuge B, Beckman) a 3000 rpm durante 30 segundos o con y se lavaron 3 veces con agua destilada. Tras retirar el sobrenadante las partículas se resuspendieron en agua destilada y se conservaron en este medio. En el caso de añadir mNPs éstas se incluyeron en la emulsión bajo agitación en una relación de volúmenes 2:1.

2.5. Ensayo colorimétrico

El ensayo colorimétrico engloba tres etapas: primero se suspendieron las partículas en una disolución acuosa de azul de metileno (MB) a una concentración de MB de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ y pH=7 durante 4 horas, posteriormente se lavaron las partículas para retirar el exceso de MB y por último se liberó el MB, anclado a los grupos funcionales, en agua a pH=3 (para COO^-) o pH=1 (para SO_3^-) para ser medido por espectroscopía UV-Vis (UV-visible Cary 3 BIO-Varian). Se calculó el coeficiente de extinción molar del MB en agua a partir de la ecuación de Lambert Beer (1) mediante el empleo de disoluciones de concentración conocida obteniéndose un $\epsilon = 15123.78 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$A = \epsilon c l \quad (1)$$

Donde A es la absorbancia, c la concentración y l el paso óptico ($l=1 \text{ cm}$).

La densidad de grupos funcionales en la superficie se calculó en función de la concentración obtenida por la absorbancia del MB liberado y el coeficiente de extinción molar teniendo en cuenta el peso de la muestra, su tamaño, el volumen de disolución en la medida y suponiendo densidad de la partícula $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ de acuerdo a las ecuaciones 2-4.

$$\rho_{\text{grupo}} (\text{mol MB/cm}^2) = \frac{[\text{MB}] V_{\text{disolución}}}{S_{\text{total}}} \quad (2)$$

$$S_{\text{total}} = n^{\circ} \text{partículas} \times 4\pi r^2 \quad (3)$$

$$n^{\circ} \text{partículas} = \frac{m_{\text{producto}}}{m_{\text{partícula}}} = \frac{m_{\text{producto}}}{\rho \frac{4}{3}\pi r^3} \quad (4)$$

Siendo ρ la densidad, S la superficie, V el volumen, m la masa y r el radio promedio obtenido por coulter o DLS.

2.6. Caracterización-Equipos

Las emulsiones líquido/líquido se caracterizaron por microscopía óptica (eclipse E400, Nikon).

La morfología de las partículas se estudió por microscopía óptica de barrido (SEM) (XL30, Philips) a 25kV. Una gota (15-20 μ L) de la suspensión de partículas se depositó en un soporte de vidrio y se dejó secar, posteriormente se metalizó con oro (Polaron SC7640, Thermo VG Scientific). Las relaciones C/Fe se obtuvieron por una media de tres medidas del análisis de energía de dispersión de rayos X (EDX) que se realizó en un equipo EDAX, incorporado al SEM, con una ventana ultra pequeña (sutw) y un área activa de 10 mm².

La UCST se determinó midiendo la transmitancia óptica de las disoluciones de copolímero en MeOH/H₂O a 600 nm en función de la temperatura. Las mezclas se prepararon añadiendo la cantidad de agua adecuada a las emulsiones previamente diluidas en la cantidad correspondiente de metanol. El análisis se realizó en un espectrómetro UV-visible Cary 3 BIO-Varian. La temperatura se fue reduciendo de 60 a 10 °C a una velocidad de 1 °C/min. La UCST se estimó como la temperatura en el punto de inflexión de la curva de absorbancia frente a temperatura.

El tamaño promedio y la distribución de tamaños se midieron en un analizador de partículas (LS230, Beckman Coulter) o por dispersión de luz dinámica (DLS) empleando un Malvern Zetasizer nano ZS con un láser de 4 mW (He-Ne), $\lambda = 632$ nm, 173° de retrodispersión. El potencial Z se midió en el mismo equipo DLS.

3- Resultados y discusión:

3.1. Descripción teórica del sistema:

Como se ha mencionado en la introducción la copolimerización de MMA y VP en metanol da lugar a un sistema de dos fases, una fase dispersa rica en MMA y una fase continua rica en VP. En la Figura 4 la línea horizontal punteada, a la fracción molar de MMA de 0.42, indica de manera tentativa la composición instantánea límite que separa cadenas presentes en una u otra fase, de acuerdo con estudios anteriores de nuestro grupo ¹. Cadenas individuales con composiciones por encima o por debajo de este valor límite (que corresponde a una conversión de 0.66) serán parte de la fase dispersa o continua respectivamente. Mediante un simple balance de materia la media de la fracción molar de MMA en la fase continua para una conversión teórica del 100% sería 0.075.

Para este cálculo se tiene en cuenta que las fracciones molares en alimentación son $F_{M0}=0.5$ (50% de MMA y VP a tiempo 0). Puesto que a la conversión límite (0.66) se han consumido el 66 % molar de los monómeros, esto implica un 47.5/50 de MMA y un 18.5/50 de VP (de acuerdo a la $f_{MMA-cum}$ fase dispersa de 0.72, esta es la fracción molar acumulada de MMA a la conversión límite y viene dada por el programa COPOL⁴¹). Después de la conversión límite se consume el resto, 2.5/50 de MMA y 31.5/50 de VP, lo que se corresponde con un $f_{MMA-cum}$ fase continua de 0.075 (=2.5/34). En el apéndice dos se muestra un ejemplo de cálculo de estos parámetros para un sistema del capítulo 6 análogo a éste.

La Figura 4 muestra como la heterogeneidad composicional no es simétrica, es decir, las cadenas ricas en MMA incorporan aproximadamente un 20% molar de unidades VP mientras que la mayoría de las cadenas ricas

en VP son prácticamente PVP pura. En otras palabras, el empleo de metacrilatos para funcionalizar las cadenas ricas en MMA comparado con el uso de derivados de VP para funcionalizar las cadenas ricas en VP conduce a una mayor selectividad puesto que el metacrilato no se incorpora en las cadenas ricas en VP debido al consumo de MMA.

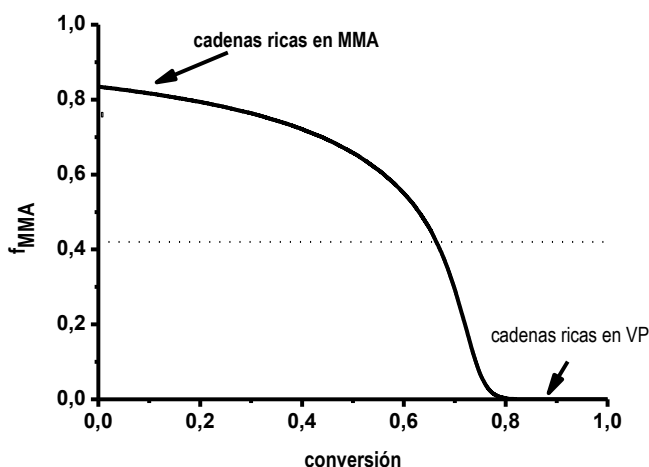


Figura 4: Fracción molar teórica instantánea de MMA en las cadenas copoliméricas frente a la conversión. La línea punteada, a la fracción molar de MMA de 0,42, indica de manera tentativa la composición instantánea límite entre la población de las dos fases. Esta gráfica ha sido obtenida utilizando el programa Copol®⁴¹.

Considerando que se han incorporado el 0,5% molar de las funcionalidades metacrilato o VP (M_F o V_F) y asumiendo que hay una homología completa en reactividad (M_F tiene la misma reactividad que MMA y V_F la misma que VP), las fracciones molares de MMA o VP son proporcionales a las de M_F y V_F . Este supuesto se puede asumir basándose en la alta diferencia de reactividad entre los derivados de VP (un monómero muy desactivado) y la familia metacrílica⁴²⁻⁴⁴ que hace que la reactividad diferencial entre los monómeros de la misma familia sea comparativamente muy baja y por tanto de poca relevancia. Por lo tanto y asumiendo un 100% de conversión, se puede calcular un factor de selectividad SF para ambas fases, que se define como la relación entre la concentración de funcionalidades en la fase homóloga y no-homóloga:

$$SF_{MF} = \frac{[f_{MMA-cum}]_{fasedispersa}}{[f_{MMA-cum}]_{fasecontinua}} = \frac{0,72}{0,075} = 9,6 \quad (4)$$

$$SF_{VF} = \frac{[f_{VP-cum}]_{fasecontinua}}{[f_{VP-cum}]_{fasedispersa}} = \frac{1-0,075}{1-0,72} = 3,3 \quad (5)$$

Empleando los datos de la Figura 3, la selectividad es tres veces mayor en el caso de añadir M_F comparado con V_F . Con el comonómero M_F más del 95% de la funcionalidad se localiza en la fase dispersa mientras que con V_F el 76% de la funcionalidad se localiza en la fase continua para una reacción a conversión total. Estos cálculos

Capítulo 5

muestran la factibilidad de la hipótesis inicial: ambas fases pueden ser funcionalizadas con una cierta selectividad, con mayor selectividad en el caso de la fase dispersa rica en MMA. A continuación se muestra la utilidad de esta consideración teórica.

3.2. Funcionalización selectiva de las fases: guiado de las Nanopartículas Magnéticas (mNPs) en las emulsiones líquido/líquido

En este trabajo se ha estudiado la interacción de varios sistemas dispersos basados en copolímeros poli(MMA-co-VP) con nanopartículas magnéticas (mNPs) estabilizadas con hidróxido de tetrametilamonio. Las mNPs tienen una superficie catiónica que puede interaccionar con grupos aniónicos complementarios como los sulfonatos. Por lo tanto se ha analizado la influencia de la incorporación de una pequeña cantidad (0,5% molar) de funcionalidad sulfonato utilizando los monómeros M_s y V_s mostrados en la Figura 2. El ácido metacrílico (M_c) también se ha estudiado con fines comparativos. El grupo sulfonato es un anión permanente que puede interaccionar fuertemente con la superficie catiónica de las mNPs. El grupo carboxílico es un ácido débil que puede ser parcialmente ionizado en agua e interaccionar con las mNPs. Se han estudiado comparativamente las cuatro copolimerizaciones que se muestra en la Tabla 1. Para el estudio, las emulsiones se han diluido 1:1 en metanol aumentando la relación de volumen fase continua / fase dispersa que era demasiado elevada.

Tabla 1: Nomenclatura y fracciones molares en alimentación de las copolimerizaciones estudiadas

Reacción	F_M	F_V	F_{Vs}	F_{Ms}	F_{Mc}
M-VP	0.50	0.50	-	-	-
M- V_s	0.50	0.495	0.005	-	-
M_s -VP	0.495	0.50	-	0.005	-
M_c -VP	0.495	0.50	-	-	0.005

M-VP corresponde a un copolímero no funcionalizado de referencia donde M es MMA y los subíndices en S o C indican el tipo de funcionalización en el grupo monómero homólogo (S para sulfonato y C para carboxilo) añadida a la solución en un 0.5% molar.

Cuando se incorporan las mNPs en la emulsión control, M-VP, estas se localizan, parcialmente aglomeradas, en la fase continua como se ve en la micrografía óptica de la Figura 5. No existen mNPs en la fase dispersa ni en la interfase indicando que las mNPs muestran una afinidad mayor por el entorno hidrofílico de las cadenas ricas en VP.

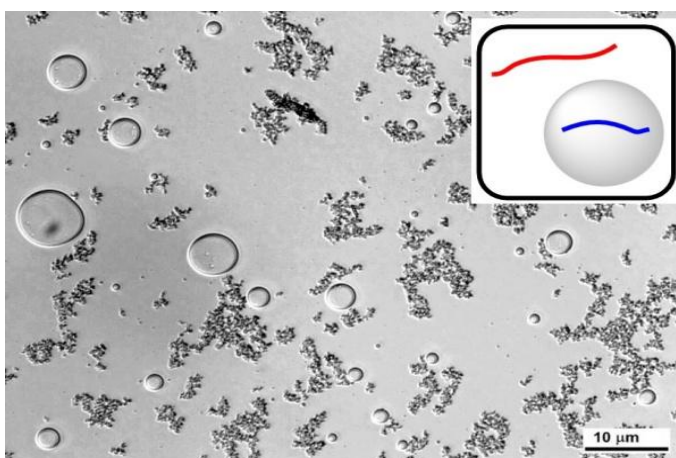


Figura 5: Micrografía óptica de la emulsión del sistema M-VP

Si se introduce la funcionalidad sulfónico mediante V_s (sistema M- V_s) las mNPs se localizan preferentemente tanto en la fase continua como en la interfase (ver figura 6), lo que demuestra la interacción de la carga positiva de las mNPs por el tetrametilamonio y los grupos sulfonatos. Esto está de acuerdo con la hipótesis inicial: el empleo de derivados de VP predominantemente funcionaliza las cadenas ricas en VP localizadas en la fase continua. Además la localización de mNPs en la interfase es interesante puesto que indica como las cadenas ricas en VP interaccionan y estabilizan de manera efectiva las gotas ricas en MMA. Como se ha mencionado en la introducción, MMA y VP son monómeros precursores típicos de núcleos sólidos y surfactantes poliméricos. Por lo tanto, la anfifilia de la PVP, que es soluble en medios orgánicos y polares incluyendo el agua, se emplea como surfactante. En base a ello se propone que las cadenas ricas en VP localizadas en la fase continua son capaces de estabilizar, en un medio polar como el metanol y/o agua las entidades dispersas ricas en hidrofóbico MMA. El guiado de las partículas magnéticas a la interfase o superficie cuando se funcionalizan las cadenas de PVP está de acuerdo con ello puesto que confirma una localización parcial de dichas cadenas en la interfase o superficie.

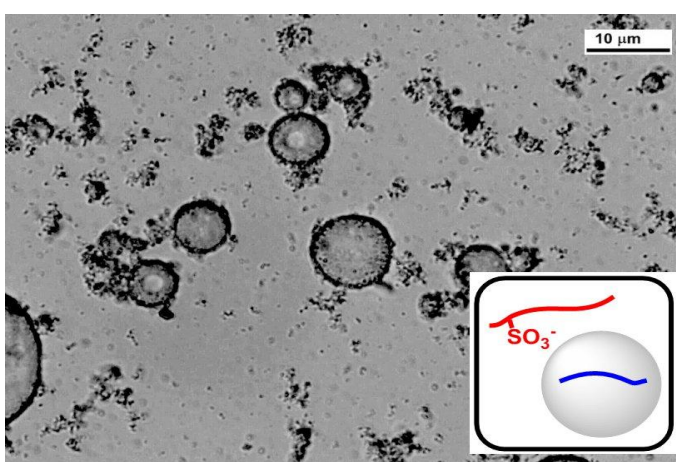


Figura 6: Micrografía óptica de la emulsión del sistema M- V_s

Capítulo 5

La micrografía óptica de la Figura 7 muestra la interacción que tiene lugar cuando las cadenas metacrílicas son las portadoras de la funcionalidad. El empleo de M_S provoca que todas las mNPs se localicen en la fase dispersa (Figura 7 A) mientras que el empleo de M_C conduce a un resultado peculiar: la mayor parte del las mNPs se localizan en la interfase (Figura 7 B). Ambos resultados confirman de nuevo la hipótesis inicial: ambas fases pueden ser funcionalizadas selectivamente. Además, el hecho de que la mayor parte del las mNPs se encuentren en la interfase o en la fase dispersa está de acuerdo con la alta selectividad predicha para la funcionalización del sistema metacrílico comparado con la derivatización en VP.

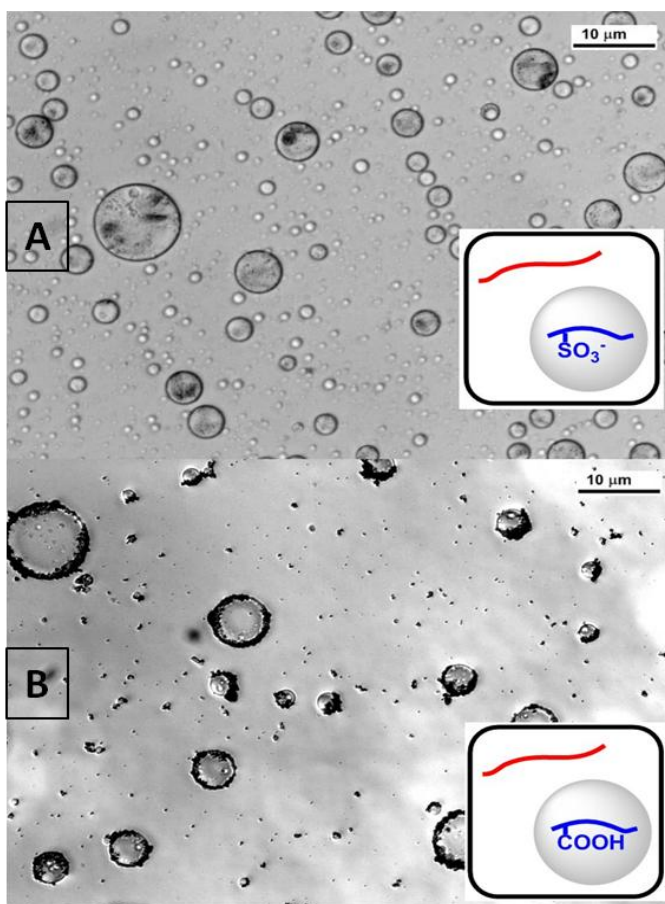


Figura 7: (A) Micrografía óptica de la emulsión del sistema M_S -VP. (B) Micrografía óptica de la emulsión del sistema M_C -VP

En el caso de M_S -VP, las cadenas ricas en MMA presentes en la fase dispersa llevan grupos sulfonatos que interaccionan fuertemente con la superficie catiónica de las mNPs. En el caso de las emulsiones M_C -VP, las mNPs parecen balancear la interacción entre las dos fases. Interaccionan con los grupos COO^- de las cadenas ricas en MMA de la fase dispersa pero no se localizan dentro como en el caso de la emulsión M_S -VP. Aquí la interacción no es tan fuerte como con el anión permanente SO_3^- y la afinidad a la fase continua probablemente

provoca el guiado de las partículas a la interfase para satisfacer ambas afinidades. Este comportamiento puede tomarse como un ejemplo de autoensamblado de las partículas a la interfase líquido/líquido, un fenómeno bien conocido para diversos sistemas coloidales en interfases aceite/agua o líquido/líquido ³². Como se ha mencionado anteriormente, las características de polaridad y carga de la superficie pueden modular la interacción de las nanopartículas con la interfase ³⁴⁻³⁶. En este contexto, la presencia de grupos carboxílicos en la fase dispersa en el sistema M_C-VP permite la interacción selectiva de las mNPs con la interfase.

3.3. Formación de partículas sólidas: Funcionalización selectiva de la superficie o el núcleo

Como se describió en trabajos anteriores de nuestro grupo ¹, a partir de las emulsiones es posible obtener partículas sólidas por adición de agua a la emulsión en agitación por endurecimiento de la fase dispersa (ver Figura 8). Como se ha detallado en la introducción las partículas de PMMA se suelen obtener por diversas vías siendo en la mayor parte de ellas necesario añadir un surfactante para estabilizarlas. El sistema descrito en este trabajo presenta la particularidad de ser un sistema “autoestabilizante”, es decir, los propios componentes de la polimerización son capaces de formar partículas sólidas estabilizadas sin necesidad de añadir un surfactante extra. Las cadenas ricas en VP estabilizan las partículas ricas en MMA y a su vez permiten una funcionalización selectiva hacia la superficie.

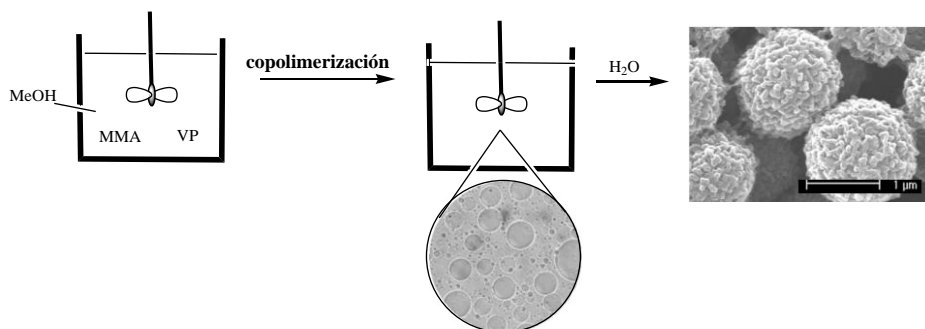


Figura 8: Representación esquemática de la formación de partículas por adición de agua a la emulsión formada por la copolimerización radical en metanol de MMA y VP

En este apartado se ha analizado la posibilidad de formar partículas sólidas en las que se traslade la funcionalización selectiva que se ha conseguido en las emulsiones. Es decir, se ha estudiado la funcionalización selectiva de la superficie o el núcleo de las partículas. En primer lugar se ha estudiado el endurecimiento de las emulsiones portadoras de mNPs, descritas anteriormente.

Las emulsiones M-V_s y M_C-VP pueden ser fácilmente endurecidas añadiendo agua por goteo bajo agitación a temperatura ambiente obteniéndose microesferas sólidas. Las Figuras 9 y 10 muestran las micrografías SEM de las microesferas obtenidas de M-V_s y M_C-VP, respectivamente. Las microesferas para estos dos sistemas presentan las mNPs localizadas aleatoriamente en la superficie como lo indica la relación C/Fe obtenida a partir del análisis EDX. Esto está claramente relacionado con la emulsión de origen donde las mNPs se localizaban mayoritariamente en la interfase como se ha mostrado en las Figuras 6 y 7B. Además, se aprecian agregados de mNPs en la micrografía de M-V_s (Figura 9) y no en el caso de M_C-VP (Figura 10). De nuevo, esto está de acuerdo con el estudio inicial de las emulsiones de origen y con la hipótesis inicial: en el sistema M-V_s, las

Capítulo 5

cadenas funcionalizadas ricas en VP están principalmente en la fase continua y en la interfase (estabilizando las gotas hidrofóbicas) mientras que en M_C-V la funcionalización es bastante selectiva hacia la fase dispersa. En ambos casos se observa como al formarse las microesferas sólidas las mNPs se quedan en la superficie guiadas por los grupos sulfonato o carboxílico.

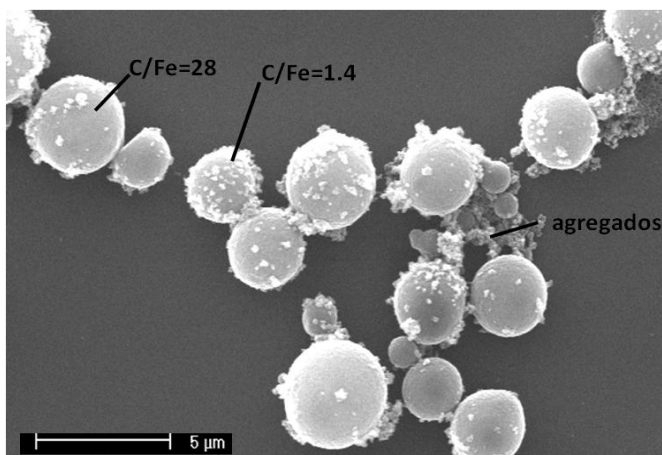


Figura 9: Micrografía SEM de las microesferas obtenidas por adición de agua al sistema emulsificado $M-V_s$ + mNPs. Se incluyen las relaciones C/Fe de áreas representativas. También se indica en la gráfica una región con agregados de mNPs.

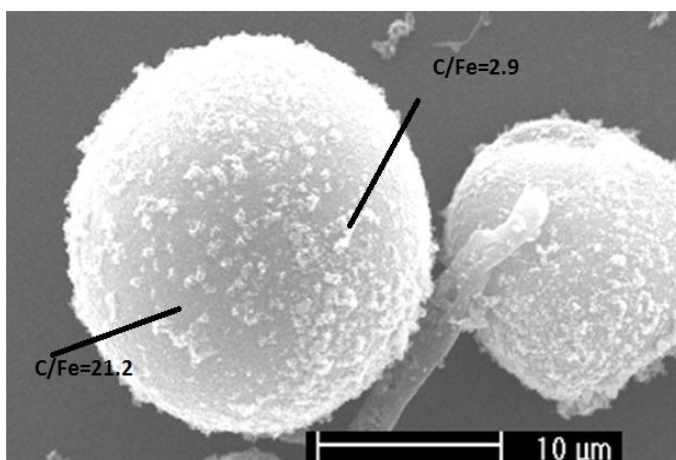


Figura 10: Micrografía SEM de las microesferas obtenidas por adición de agua al sistema emulsificado M_C-V P+ mNPs. Se incluyen las relaciones C/Fe de áreas representativas.

$M-V_S$ y $MC-V_P$ son sistemas dispersos durante todo el proceso de adición de agua a temperatura ambiente. Las gotas de la emulsión líquido/líquido de origen en metanol, se convierten en las microesferas sólidas en agua, es decir, las gotas “nuclean” las microesferas sólidas. Por lo tanto, la funcionalización de la fase continua o la interfase se traslada a una funcionalización superficial de las partículas sólidas.

Sin embargo, la emulsión M_S-VP no puede ser endurecida con agua a temperatura ambiente puesto que la separación de fases desaparece cuando se alcanza una composición crítica metanol/agua y a mayores relaciones metanol/agua se produce un proceso de precipitación obteniéndose un precipitado de forma irregular en lugar de microesferas (ver Figura 11).

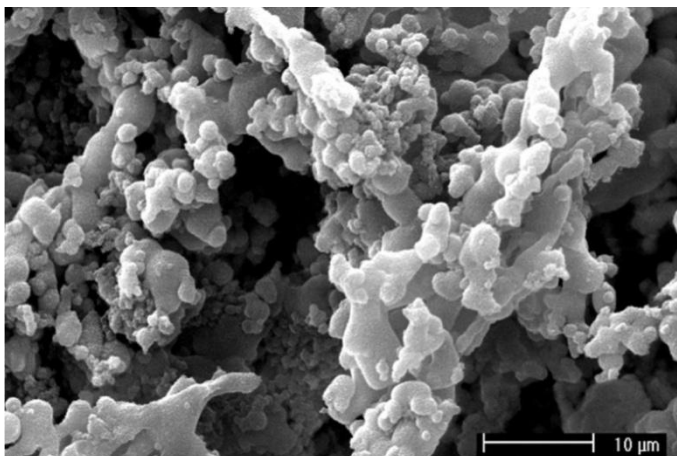


Figura 11: Micrografía SEM del precipitado obtenidas por adición de agua al sistema emulsificado M_S-VP (sin mNPs)

Este fenómeno de formación de una solución homogénea cuando se añade agua está relacionado con el conocido comportamiento de cosolencia de PMMA en mezclas metanol/agua (así como en otras mezclas de agua con alcoholes alifáticos)^{2,45}. Aunque el agua no es un disolvente para PMMA se ha descrito una solvatación preferente de las cadenas poliméricas a determinadas relaciones metanol/agua⁴⁶. Ello se refleja en el hecho de que los valores de UCST para esas relaciones metanol/agua son menores que la UCST en metanol puro, existiendo por tanto un mínimo en UCST para una relación volumétrica concreta, aquella que mejor solvata el polímero.

El proceso de formación de partículas es, por lo tanto, un proceso complejo en términos de variación de la UCST y de las características de la fase dispersa al ir aumentando la relación agua/metanol en el medio. Las cadenas que sufren el fenómeno de UCST son las cadenas ricas en MMA y por lo tanto cualquier variación en su composición afecta a dicho fenómeno. Un ejemplo muy claro, representado en la Figura 12, se encuentra cuando se varía la relación de monómeros M:VP en la copolimerización. Una relación molar M:VP de 1:2 (sistema M-VP 1:2), comparado con la reacción equimolar estudiada aquí (M-VP), hace que la fracción molar promedio de las cadenas ricas en MMA pase de 0.72 a 0.64 [1] y tenga lugar la variación en el fenómeno de cosolencia que se muestra en la Figura 12. Todas las UCSTs son inferiores a la reacción equimolar, y además el fenómeno de cosolencia es más acusado y el mínimo se localiza a menores fracciones en volumen de MeOH, lo cual está de acuerdo con la mayor hidrofiliía de dichas cadenas. La UCST, en este caso, está por debajo de temperatura ambiente para un cierto intervalo de relación en volumen MeOH/agua (en este intervalo obviamente no hay separación de fases a temperatura ambiente).

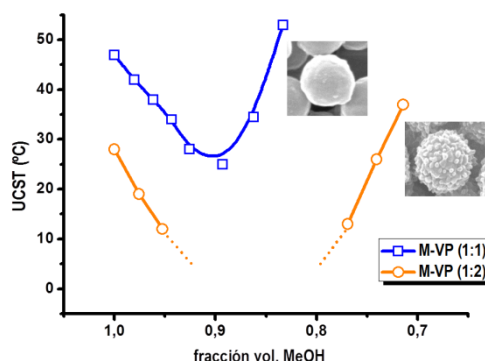


Figura 12 :Dependencia de la UCST con la fracción en volumen de metanol en mezclas metanol/agua de los sistemas M-VP a distinta composición ((1:1) azul, (1:2) naranja). En la figura también se muestran micrografías SEM representativas de las partículas obtenidas para cada uno de los tres sistemas.

El sistema equimolar M-VP (1:1) presenta una curva de UCST en la que se alcanza un mínimo entorno a 0.9 en fracción de volumen de metanol a partir del cual los valores de UCST vuelven a subir al imponerse las interacciones hidrofóbicas entre cadenas al aumento de la solvatación generada por la mezcla metanol/agua. Para M-VP (1:2) hay un amplio intervalo en el que la UCST está por debajo de temperatura ambiente, perdiéndose por tanto la separación de fases. Estas diferencias en la variación de la UCST influyen el proceso y la nanoestructuración superficial, como puede observarse en las micrografías SEM de la Figura 12. Cuánto más rica es la alimentación en VP mayor es la nanoestructuración de la superficie, este hecho se relacionó en la ref 1 con un fenómeno continuo de precipitación/adsorción superficial.

En la Figura 13 se muestran los valores de UCST de los sistemas funcionalizados estudiados en este trabajo en función de la fracción de volumen de metanol, determinadas por turbidimetría. El efecto de cosolvencia es evidente en todos los sistemas al observarse como disminuye la UCST en la mezcla MeOH/agua hasta una determinada composición. Todos ellos tienen unas curvas similares a la de M-VP control (sin funcionalizar) excepto M_S -VP, que muestra valores claramente inferiores, y una cosolvencia más acusada (y un amplio intervalo de UCST donde se pierde la separación de fases homogeneizándose el sistema). Ésto está de acuerdo con el comportamiento del sistema M-VP 1:2 mencionado antes y con la mayor hidrofilia de las cadenas ricas en MMA debido a la incorporación de grupos sulfonato, que aunque se encuentran en muy pequeña proporción aportan un grupo iónico con gran afinidad por el agua. La adición de agua a temperatura ambiente en el sistema M_S -VP conduce muy rápidamente a la homogeneización completa. Al seguir añadiendo agua, a mayores relaciones metanol/agua tiene lugar un proceso de precipitación que da lugar a un precipitado sólido de forma irregular como se mostró en la Figura 11. Este comportamiento es muy diferente al del sistema M-VP 1:2 de la Figura 12 que, presentando una curva UCST muy similar, sí es capaz de formar microesferas sólidas en el proceso de endurecimiento. Esta diferencia tan singular puede estar relacionada con las características de concentración de la fase dispersa en el momento en que 'reaparece', es decir, cuando la UCST alcanza de nuevo temperatura ambiente en el proceso de adición de agua. La fase dispersa que 'reaparece' en el sistema M-VP 1:2 podría tener suficiente disolvente puede formar gotas esféricas y nuclear las futuras partículas, mientras que en el caso

de M_S -VP si la fase dispersa tuviera muy poco metanol, se podría considerar prácticamente un sólido incapaz de formar gotas.

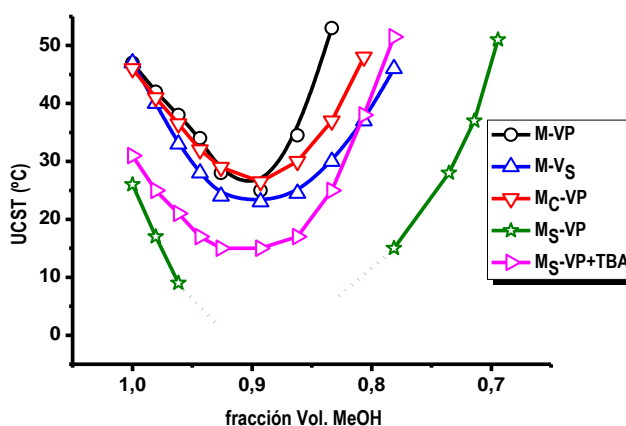


Figura 13 :Dependencia de la UCST con la fracción en volumen de metanol en mezclas metanol/agua de los sistemas a estudio. Se añaden un total de 2 equiv de TBA (por grupo sulfonato) al sistema M_S -V + TBA.

El sistema M - V_S también incorpora grupos sulfonato pero estos se encuentran en las cadenas ricas en VP que forman la fase continua y que no sufren el efecto de UCST de los copolímeros de la fase dispersa. En este caso existe separación de fases durante todo el proceso de adición de agua a temperatura ambiente hasta la formación de las microesferas sólidas. Por lo tanto, la funcionalización selectiva de la fase dispersa o continua (cadenas ricas en MMA o VP respectivamente) tiene una influencia muy diferente en la dependencia de la UCST y en el proceso de endurecimiento a temperatura ambiente (así como en el proceso de formación de las microesferas sólidas). M_C -VP, que como M_S -VP aporta la funcionalidad en las cadenas metacrílicas, muestra un comportamiento similar a M - V_S pero diferente a M_S -V. En este caso, los valores de UCST para M_C -VP muestran una separación de fases a cualquier relación metanol/agua y las gotas pueden ser endurecidas formando las microesferas sólidas. Esto puede explicarse en función de la distinta naturaleza de las funcionalidades M_C -VP y M_S -VP: un grupo carboxílico parcialmente ionizado y un anión permanente sulfonato, respectivamente.

En el caso concreto de la emulsión M_S -VP donde las mNPs son guiadas al interior de las gotas de la fase dispersa (ver figura 7, arriba), la precipitación incontrolada al recuperarse la separación de fases impide la preparación de microesferas poliméricas sólidas cargadas con mNPs en el núcleo. Sin embargo, este descenso en la UCST puede ser químicamente modulado obteniendo fácilmente mNPs encapsuladas en el núcleo de las microesferas. Aceptando que la carga del sulfonato es la que provoca esta desviación, se compleja el anión extra con un catión hidrofóbico, terbutilamonio (TBA). Como resultado, el anión sulfonato se “bloquea” y la curva de UCST se desplaza a temperaturas más altas como se observa en la Figura 13, evitando la precipitación incontrolada.

A pesar de la complejación con TBA, el grupo sulfonato sigue guiando todas las mNPs al interior de las gotas de la fase dispersa en la emulsión en metanol (Figura 14).

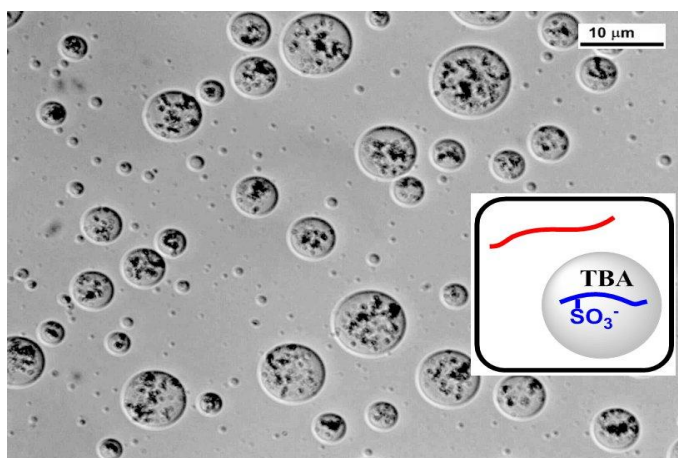


Figura 14: Micrografía óptica de la emulsión del sistema M_s -VP + TBA

El incremento de la UCST permite la preparación de microesferas sólidas cargadas con mNPs en el núcleo por adición de agua a temperatura ambiente (Figura 15) puesto que se mantiene la separación de fases en todo el proceso sin producirse precipitaciones incontroladas. La localización de mNPs en el núcleo se ha confirmado por los datos de relación C/Fe obtenidos por EDX.

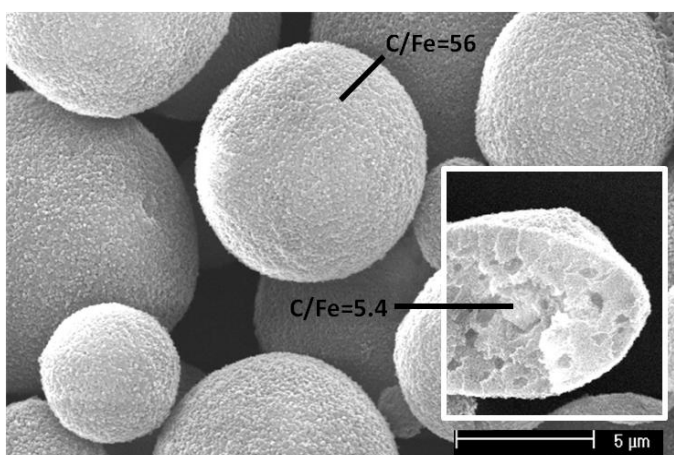


Figura 15: Micrografía SEM de las microesferas obtenidas por adición de agua al sistema emulsificado M_s -VP + TBA + mNPs. Se incluyen las relaciones C/Fe de áreas representativas.

3.4. Funcionalización de superficies

Los resultados descritos en los apartados anteriores confirman que se pueden funcionalizar superficialmente microesferas basadas en MMA de forma muy sencilla y en prácticamente un solo paso, simplemente añadiendo un bajo porcentaje (0,5-2%) de VP funcionalizada a la copolimerización en metanol. Este monómero formará parte de las cadenas ricas en VP que estabilizan las gotas de la fase dispersa así como la superficie de las microesferas sólidas obtenidas tras el proceso de endurecimiento mediante la adición de agua. Dado el interés de la funcionalización superficial de este tipo de partículas ²⁴⁻²⁶, se ha llevado a cabo un estudio más detallado

del proceso. En concreto se ha evaluado la incorporación de grupos carboxílicos, además de los sulfónicos descritos anteriormente (Figura 16). Los grupos sulfonato y carboxilato son grupos muy atractivos en biomedicina y biotecnología, en procesos como complejación y separación de proteínas, bioconjugación⁴⁷, etc.

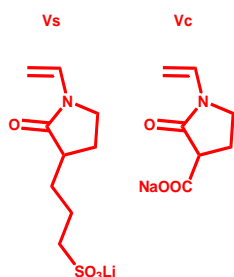


Figura 16: Estructura de los comonómeros añadidos al 0.5 o 2% molar a las copolimerizaciones equimolares de MMA y VP en metanol

Se han preparado las copolimerizaciones que se muestran en la Tabla 2 con dos grados de modificación para cada funcionalidad, 0,5 y 2% molar. Se ha estudiado además la influencia de la relación en volumen de las dos fases en el tamaño de las partículas. El tamaño de partícula se ha medido por Coulter o DLS (en función del tamaño observado en las micrografías SEM y de su estabilidad en suspensión acuosa) y su carga superficial se ha analizado de manera cualitativa por potencial Zeta para aquellas muestras que han podido medirse en DLS. Los resultados se muestran en la tabla 4.

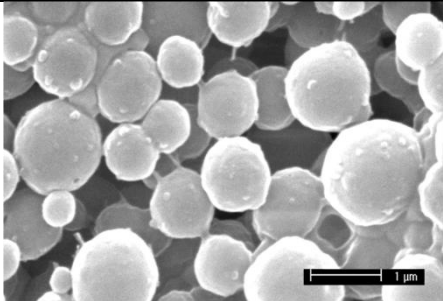
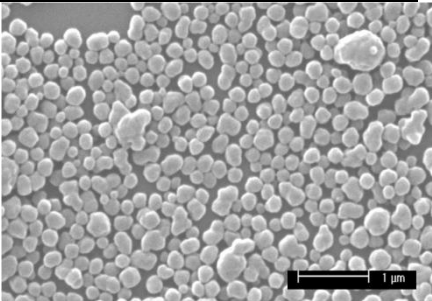
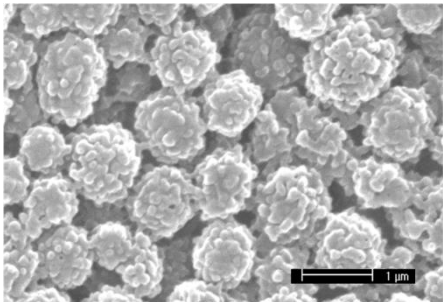
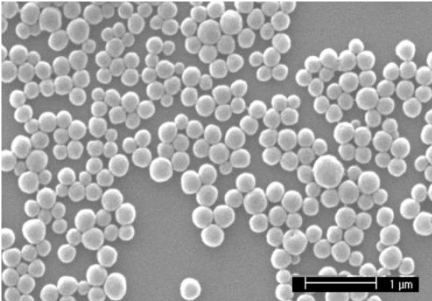
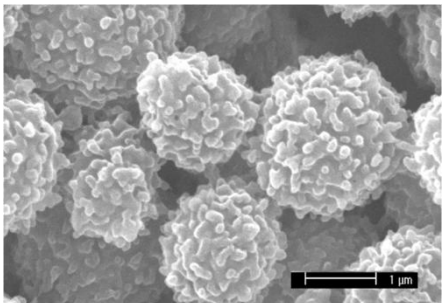
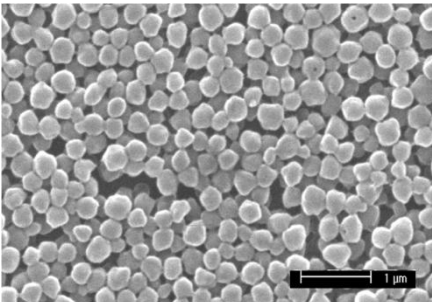
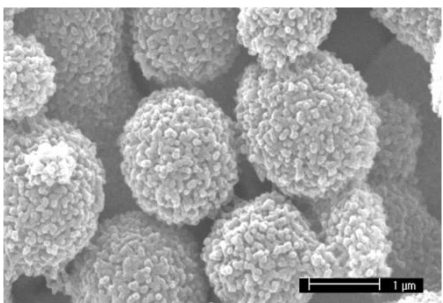
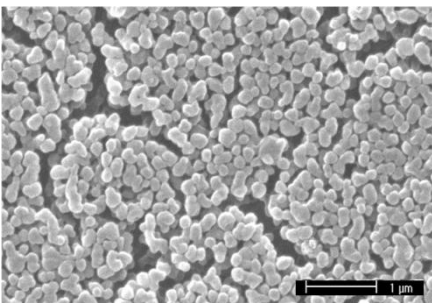
Tabla 2: Nomenclatura y fracciones molares en alimentación de las copolimerizaciones MMA-VP para el estudio de funcionalización superficial.

Reacción	F _M	F _{VP}	F _{Vs}	F _{Vc}
M-V_S-0.5	0.50	0.495	0.005	-
M-V_S-2.0	0.50	0.480	0.020	-
M-V_C-0.5	0.50	0.495	-	0.005
M-V_C-2.0	0.50	0.480	-	0.020

De acuerdo al apartado anterior, la adición de estas funcionalidades va a tener en principio una pequeña influencia en el proceso de endurecimiento ya que se están modificando preferentemente las cadenas ricas en VP que no sufren UCST. Usando las condiciones descritas en el apartado anterior (dilución inicial 1:1 y adición de agua gota a gota), todas las reacciones han formado microesferas, siendo los diámetros promedio entre 0.5 y 2 micras (ver Tablas 3 y 4, procesos con dilución 1:1). Estas microesferas muestran diferentes nanoestructuras superficiales, como se observa en las micrografías de SEM. Las diferencias en los tamaños de los dominios nanoestructurados podría deberse a diferencias en el fenómeno continuo de precipitación/adsorción superficial, que se ha propuesto como responsable de la nanoestructuración¹.

Capítulo 5

Tabla 3: Micrografías SEM de las partículas obtenidas a partir de los sistemas descritos en la tabla 3 para la funcionalización superficial

Reacción	SEM (20.000X)	
	Dilución 1:1	Dilución 1:4
M-Vs-0.5		
M-Vs-2.0		
M-Vc-0.5		
M-Vc-2.0		

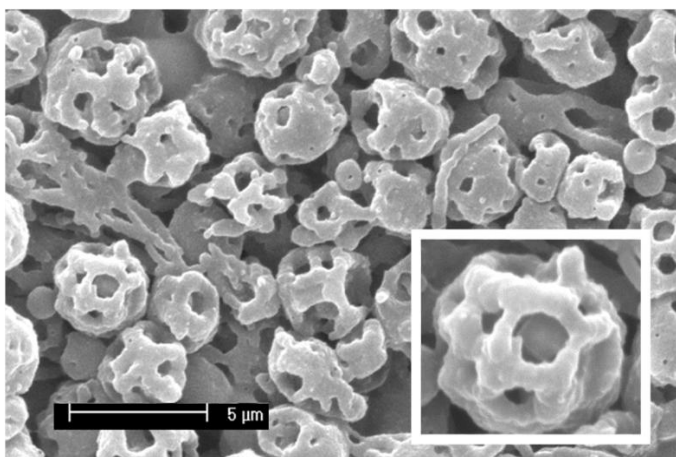


Figura 17: Micrografía SEM de las microesferas porosas obtenidas por adición de agua al sistema emulsificado M-V_c sin dilución previa.

En las Tablas 3 y 4 (procesos de dilución 1-4), se muestran las características de las partículas obtenidas cuando se aumenta la relación de volúmenes fase continua/dispersa mediante una dilución 1:4 en metanol de la disolución original. Se observa que este aumento hace que se obtengan nanoesferas sin nanoestructuración superficial, mucho mas monodispersas y con diámetros entre 150-400 nm. En términos generales se podría decir que en dilución 1:1 se obtienen microesferas polidispersas y en dilución 1:4 nanoesferas con baja polidispersidad.

También se han intentado endurecer las emulsiones originales sin diluir y se han obtenido en algunos casos partículas porosas como las de la Figura 17. Estas partículas pueden ser de interés debido a la alta superficie específica que presentan.

Las partículas obtenidas en dilución 1:4 son estables en solución acuosa lo que permite medir su tamaño y potencial Z por DLS; cualitativamente se observa como la superficie de la partícula se encuentra cargada negativamente debido a los grupos funcionales iónicos o ionizables introducidos con las VP funcionalizadas V_S y V_C respectivamente. Para todas las partículas, se ha evaluado de forma cuantitativa la densidad de grupos funcionales en la superficie por colorimetría con azul de metileno (MB). MB (ver estructura Figura 18) es un colorante soluble en agua que se encuentra cargado a pH neutro y por lo tanto puede establecer interacciones electrostáticas con polianiones.

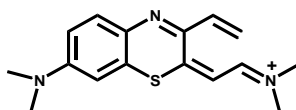


Figura 18: Estructura del azul de metileno a pH=7

Capítulo 5

Los resultados del ensayo colorimétrico se muestran en la Tabla 4 como molMB/cm² puesto que el MB medido por UV es aquel que estaba anclado a la superficie de las partículas.

El ensayo colorimétrico con azul de metileno permite dar un dato aproximado de densidad de grupos funcionales por unidad de superficie, observándose como el aumento del 0,5% molar al 2% molar incrementa la densidad de grupos en la superficie en un orden de magnitud. Sin embargo, estos datos están aún en proceso de mejora dadas las dificultades encontradas por los procesos de adsorción y la fuerte interacción del MB con los grupos sulfonatos.

El estudio de colorimetría además de permitir conocer la densidad de grupos por unidad de superficie muestra indirectamente la capacidad de la superficie tanto para reaccionar como adsorber moléculas de bajo peso molecular.

Tabla 4: Valores de tamaño, polidispersidad, potencial Z y densidad de grupos funcionales para los sistemas descritos en la tabla 3 para la funcionalización superficial.

Reacción	Dilución ^{a)}	Tamaño ^{b)} (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	ρ grupos(molMB/cm ²)
M-V_{S-0.5}	1:1	701	0.425	-	4.43E-12
	1:4	266	0.032	-30.9	1.68E-12
M-V_{S-2.0}	1:1	520	0.547	-	3.27E-11
	1:4	193	0.009	-35.7	4.59E-11
M-V_{C-0.5}	1:1	1294	0.729	-	9.38E-12
	1:4	364	0.098	-28.2	1.63E-12
M-V_{C-2.0}	1:1	2000	0.685	-	7.80E-11
	1:4	303	0.145	-28.0	1.21E-10

a)Dilución emulsión:MeOH.b)Tamaño de partícula

4- Conclusiones:

La polimerización de MMA y VP en agitación da lugar a un sistema emulsificado compuesto por una fase continua y otra dispersa formadas por cadenas ricas en VP y MMA respectivamente que pueden ser funcionalizadas con bastante selectividad por un procedimiento de un solo paso utilizando una pequeña cantidad de monómero homólogo funcionalizado.

Esta selectividad se ha confirmado empleando comonómeros funcionalizados con grupos sulfonato o ácido carboxílico y monitorizando la localización de nanopartículas magnéticas (mNPs) con superficie catiónica. En función de la homología y de la capacidad de anionizarse del comonómero las mNPs se localizan en la fase continua, dispersa o en la interfase. La localización de mNPs en la interfase demuestra el papel de las cadenas ricas en VP como estabilizantes.

Funcionalización selectiva de sistemas dispersos poli(MMA-co-VP)

Además las emulsiones pueden ser endurecidas añadiendo agua formándose partículas sólidas. Esto permite preparar de una manera sencilla microesferas compuestas con una localización selectiva de las funcionalidades (y en su caso de las mNPs) en el interior o en la superficie.

La funcionalización superficial con VPs modificadas abre una nueva y sencilla vía en la funcionalización de partículas basadas en MMA.

5- Bibliografia:

- 1 Aranaz, I., Reinecke, H., Elvira, C. & Gallardo, A. Compositionally-tunable surface nanostructuration of microspheres obtained from a self-stabilizing copolymerization of methylmethacrylate and vinylpyrrolidone. *Polymer* **52**, 2991-2997 (2011).
- 2 Cowie, J., McEwen, I. & Garay, M. Polymer--Cosolvent Systems: Synergism and Antisynergism of Solvent Mixtures for Polymethyl Methacrylate. *Polym. Commun.* **27**, 122-124 (1986).
- 3 Ishii, N. & Inoue, K. Synthesis and regular reflection property of cocoon-like poly (methyl methacrylate) particles by seeded suspension polymerization. *Polymer bulletin* **63**, 653-662 (2009).
- 4 Karagoz, B., Gunes, D. & Bicak, N. Preparation of Crosslinked Poly (2-bromoethyl methacrylate) Microspheres and Decoration of Their Surfaces with Functional Polymer Brushes. *Macromolecular Chemistry and Physics* **211**, 1999-2007 (2010).
- 5 Zhang, H. T., Yuan, X. Y. & Huang, J. X. Study of kinetics and nucleation mechanism of dispersion copolymerization of methyl methacrylate and acrylic acid. *Reactive and functional polymers* **59**, 23-31 (2004).
- 6 Cao, K., Li, B. G. & Pan, Z. R. Micron-size uniform poly (methyl methacrylate) particles by dispersion polymerization in polar media. IV. Monomer partition and locus of polymerization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **153**, 179-187 (1999).
- 7 Watanabe, S., Kobayashi, T., Sumitomo, H., Murata, M. & Masuda, Y. Preparation of monodisperse PMMA particles by dispersion polymerization of MMA using poly (styrene-co-methacrylic acid) copolymer as a steric stabilizer. *Polymer bulletin* **65**, 543-550 (2010).
- 8 Bonfá, A., Saito, R. S. N., França, R. F. O., Fonseca, B. A. L. & Petri, D. F. S. Poly (ethylene glycol) decorated poly (methylmethacrylate) nanoparticles for protein adsorption. *Materials Science and Engineering: C* **31**, 562-566 (2011).
- 9 Wang, H. H. & Chu, H. H. The stabilization effect of mixed-surfactants in the emulsion polymerization of methyl methacrylate. *Polymer bulletin* **24**, 207-214 (1990).
- 10 Gonçalves, O. H., Staudt, T., de Araújo, P. H. H. & Machado, R. A. F. Foaming of poly (methyl methacrylate) particles. *Materials Science and Engineering: C* **29**, 479-484 (2009).
- 11 Ma, Y., Cao, X., Feng, X. & Zou, H. Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90°. *Polymer* **48**, 7455-7460 (2007).
- 12 Park, J. H. *et al.* Close-packed SiO₂/poly (methyl methacrylate) binary nanoparticles-coated polyethylene separators for lithium-ion batteries. *Journal of Power Sources* **195**, 8306-8310 (2010).
- 13 Bettencourt, A. & Almeida, A. J. Poly (methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. *Journal of Microencapsulation* **29**, 353-367 (2012).
- 14 Klemm, K. The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clinical microbiology and infection* **7**, 28-31 (2001).

- 15 Lou, P. J. *et al.* PMMA particle-mediated DNA vaccine for cervical cancer. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **88**, 849-857 (2009).
- 16 Poovi, G., Kishore, N. & Reddy, P. N. In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* **396**, 194-203 (2010).
- 17 Cui, Y. (Google Patents, 2010).
- 18 Camli, S. T., Buyukserin, F., Yavuz, M. S. & Budak, G. G. Fine-tuning of functional poly (methylmethacrylate) nanoparticle size at the sub-100nm scale using surfactant-free emulsion polymerization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **366**, 141-146 (2010).
- 19 Sairam, M., Ramesh Babu, V., Krishna Rao, K. & Aminabhavi, T. Poly (methylmethacrylate)-poly (vinyl pyrrolidone) microspheres as drug delivery systems: Indomethacin/cefadroxil loading and in vitro release study. *Journal of Applied Polymer Science* **104**, 1860-1865 (2007).
- 20 Kim, G., Lim, S., Lee, B. H., Shim, S. E. & Choe, S. Effect of homogeneity of methanol/water/monomer mixture on the mode of polymerization of MMA: Soap-free emulsion polymerization versus dispersion polymerization. *Polymer* **51**, 1197-1205 (2010).
- 21 Minami, H., Yoshida, K. & Okubo, M. Preparation of polystyrene particles by dispersion polymerization in an ionic liquid. *Macromolecular Rapid Communications* **29**, 567-572 (2008).
- 22 Feng, M. & Li, P. Amine-containing core-shell nanoparticles as potential drug carriers for intracellular delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80**, 184-193 (2007).
- 23 Changerath, R., Nair, P. D., Mathew, S. & Nair, C. Poly (methyl methacrylate)-grafted chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **89**, 65-76 (2009).
- 24 Sivakumar, M. & Rao, K. P. Synthesis and characterization of poly (methyl methacrylate) functional microspheres. *Reactive and functional polymers* **46**, 29-37 (2000).
- 25 Rao, J. P. & Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* **36**, 887-913 (2011).
- 26 Caputo, A. *et al.* Induction of humoral and enhanced cellular immune responses by novel core-shell nanosphere-and microsphere-based vaccine formulations following systemic and mucosal administration. *Vaccine* **27**, 3605-3615 (2009).
- 27 Binks, B. P. Colloidal particles at liquid interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**, 6298-6299 (2007).
- 28 Caruso, F., Spasova, M., Susa, A., Giersig, M. & Caruso, R. A. Magnetic nanocomposite particles and hollow spheres constructed by a sequential layering approach. *Chemistry of materials* **13**, 109-116 (2001).
- 29 Pickering, S. U. Emulsions. *J. Chem. Soc.* **91**, 2001-2021 (1907).
- 30 Shenhar, R. & Rotello, V. M. Nanoparticles: scaffolds and building blocks. *Accounts of chemical research* **36**, 549-561 (2003).

Capítulo 5

- 31 Eskandar, N. G., Simovic, S. & Prestidge, C. A. Synergistic effect of silica nanoparticles and charged surfactants in the formation and stability of submicron oil-in-water emulsions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 6426-6434 (2007).
- 32 Gautier, F. *et al.* Pickering emulsions with stimuable particles: from highly-to weakly-covered interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 6455-6462 (2007).
- 33 Horozov, T. S., Binks, B. P. & Gottschalk-Gaudig, T. Effect of electrolyte in silicone oil-in-water emulsions stabilised by fumed silica particles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9**, 6398-6404 (2007).
- 34 Caruso, F., Susha, A. S., Giersig, M. & Möhwald, H. Magnetic core-shell particles: preparation of magnetite multilayers on polymer latex microspheres. *Advanced Materials* **11**, 950-953 (1999).
- 35 Shiho, H., Manabe, Y. & Kawahashi, N. Magnetic compounds as coatings on polymer particles and magnetic properties of the composite particles. *J. Mater. Chem.* **10**, 333-336 (2000).
- 36 Sayar, F., Güven, G. & Pişkin, E. Magnetically loaded poly (methyl methacrylate-co-acrylic acid) nanoparticles. *Colloid & Polymer Science* **284**, 965-978 (2006).
- 37 Ziolo, R. F. *et al.* Matrix-mediated synthesis of nanocrystalline γ -Fe₂O₃: A new optically transparent magnetic material. *Science* **257**, 219-223 (1992).
- 38 Brulé, S. *et al.* Doxorubicin release triggered by alginate embedded magnetic nanoheaters: A combined therapy. *Advanced Materials* **23**, 787-790 (2011).
- 39 Bencini, M. *et al.* Synthesis of 3, 3-Di (ethoxycarbonyl)-1-vinylpyrrolidin-2-one and Determination of Its Reactivity Ratios with 1-Vinylpyrrolidin-2-one. *Macromolecules* **38**, 8211-8219 (2005).
- 40 Utkan, G. G. *et al.* Synthesis and characterization of nanomagnetite particles and their polymer coated forms. *Journal of colloid and interface science* **353**, 372-379 (2011).
- 41 Copol®, R. N., May 2004. Part of the program can be found at: Gallardo, A.; Aguilar, M.R.; Abraham, G.; San Román, J. J. *Chem. Edu.*, . 1210-1215 (2004).
- 42 Bork, J. F. & Coleman, L. Nitrogen-containing monomers. II. Reactivity ratios of n-vinylloxazolidone and N-vinylpyrrolidone with vinyl monomers. *Journal of Polymer Science* **43**, 413-421 (1960).
- 43 Greenley, R. (Wiley, New York, 1989).
- 44 Reddy, B., Arshady, R. & George, M. Copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone with 2, 4, 5-trichlorophenyl acrylate and with 2-hydroxyethyl methacrylate: Reactivity ratios and molecular weights. *European Polymer Journal* **21**, 511-515 (1985).
- 45 Hoogenboom, R., Becer, C. R., Guerrero-Sanchez, C., Hoeppener, S. & Schubert, U. S. Solubility and thermoresponsiveness of PMMA in alcohol-water solvent mixtures. *Australian Journal of Chemistry* **63**, 1173-1178 (2010).
- 46 Cowie, J. M. G., Mohsin, M. A. & McEwen, I. J. Alcohol-water cosolvent systems for poly (methyl methacrylate). *Polymer* **28**, 1569-1572 (1987).

- 47 Pasut, G. & Veronese, F. Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Progress in Polymer Science* **32**, 933-961 (2007).

Capítulo 6

Redes de dos componentes VP-metacrilatos alifáticos. Evaluación de las propiedades conductoras de las redes al incorporar V_S

1-Introducción

En los capítulos 2 y 3 se describió la preparación de hidrogeles biocompatibles de VP usando el entrecruzante VV homólogo a VP. Además, dichas redes se cargaron con grupos sulfonato usando la mencionada ruta homóloga, es decir, usando Vs como comonomero. El grupo sulfónico, como ya se ha mencionado en varias ocasiones en capítulos anteriores, tiene gran interés en biomateriales debido a su presencia en ciertas biomoléculas y matrices extracelulares¹⁻⁴. En el caso de las redes hinchadas en agua basadas en VP, la incorporación de unidades portadoras de sulfonato de litio daría lugar a sistemas polielectrolíticos conductores. Soportes tipo hidrogel, biocompatibles y conductores como los propuestos en este trabajo, pueden ser de interés a la hora de estimular o modular las funciones de diferentes tejidos como los neuronales⁵⁻⁷. Sin embargo, dichas redes basadas en VP, altamente hidrofílicas, presentaron pobres propiedades mecánicas en hinchado y eran difícilmente manejables. Así, no se pudo estudiar la conductividad de las redes con sulfonato porque se rompían en las condiciones del experimento, que no eran excesivamente exigentes.

En este capítulo, y en el contexto de la también mencionada diferencia de reactividades entre VP y la familia de los metacrilatos, se pretenden preparar y estudiar redes de dos componentes de VP con metacrilatos con restos alifáticos flexibles e hidrofóbicos que pueden mejorar las prestaciones mecánicas. Se han elegido el metacrilato de butilo (MBu) y el de dodecilo (MDo), con diferente longitud de la cadena, a los cuales se van a denominar conjuntamente M (ver Figura 1). Estas redes anfifílicas podrán conjugar propiedades de ambos componentes; en este caso el objetivo primordial es obtener redes biocompatibles que hinchén en agua pero que presenten mejores propiedades mecánicas que las redes puras de VP. Un segundo objetivo dependiente del primero es el centrado en la incorporación de grupos sulfonato a través de Vs, y en su evaluación como membranas conductoras hinchadas en agua.

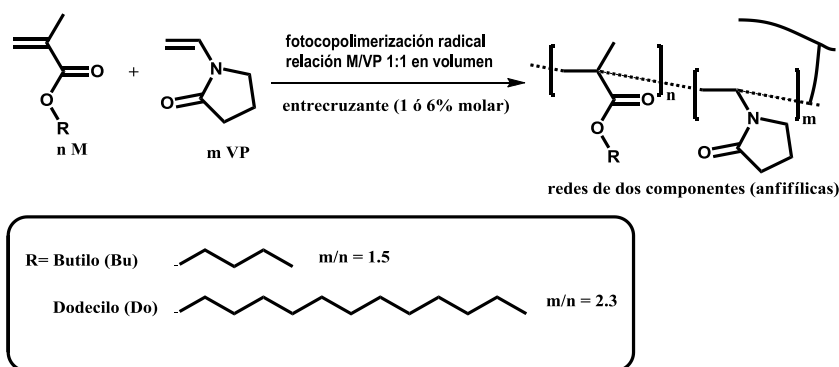


Figura 1. Esquema de la formación de redes mediante copolimerización radical.

Siendo el objetivo balancear las contribuciones de ambos componentes, el hidrofílico VP y el hidrofóbico M, se han preparado redes partiendo de una relación de VP y M de 1:1 en volumen. Esta relación se corresponde con la relación molar indicada en la Figura 1: VP:M de 1.5 y 2.3 para los sistemas MBu-VP y MDo-VP respectivamente, que se corresponden con fracciones molares de M (F_{M0}) en la alimentación de 0.40 y 0.27 respectivamente (ver Tabla 1).

Capítulo 6

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la polimerización simultánea de VP con metacrilatos da lugar a cadenas con una alta heterogeneidad composicional, formándose dos tipos principales de especies, ricas en M y ricas en VP. El entrecruzamiento efectivo de esta mezcla de cadenas puede dar lugar a materiales con estructuras y propiedades inéditas. En trabajos anteriores⁸⁻⁹ se ha descrito que la naturaleza del entrecruzante modula el entrecruzamiento en este tipo de sistemas heterogéneos. Las opciones analizadas en estos trabajos anteriores, adaptadas a las estructuras de esta tesis, se muestran en la Figura 2.

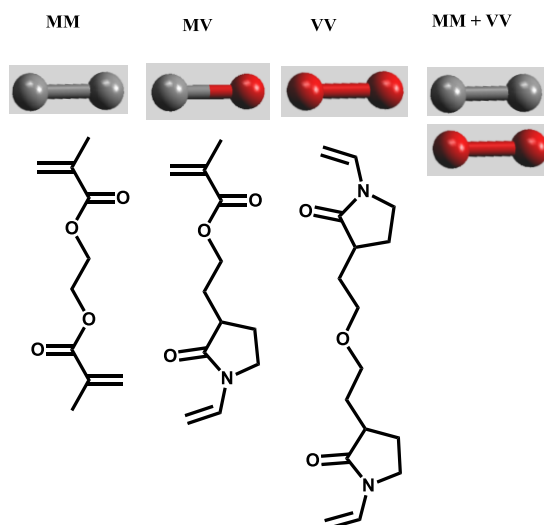


Figura 2. Estructuras de los entrecruzantes utilizados.

El entrecruzante comercial etilenglicol dimetacrilato (MM en este trabajo), que posee homología estructural con M, se incorporará predominantemente en las cadenas ricas en M, dando lugar a una red con una alta heterogeneidad en densidad de entrecruzamiento pues las cadenas ricas en M estarán más entrecruzadas que las ricas en VP. Una heterogeneidad opuesta –cadenas ricas en VP más entrecruzadas que las ricas en M– se obtendría si se usase el entrecruzante VV descrito en el capítulo 1 (su estructura se encuentra en la Figura 2), homólogo a VP.

Los trabajos antes mencionados comparaban estos entrecruzamientos (poco eficientes) con los obtenidos usando otras dos alternativas: una centrada en el uso de un entrecruzante asimétrico homólogo a VP y a M (el compuesto MV en la Figura 2) y otra en el uso de mezcla de los entrecruzantes simétricos MM y VV. Ambas alternativas dan lugar teóricamente, para el caso de copolimerización equimolar, a entrecruzamientos eficientes aunque con topologías completamente diferentes. Tal y como se muestra en la Figura 3, MV tiende a unir cadenas ricas en M con cadenas ricas en VP (es decir tiende a estructuras tipo co-red¹⁰⁻¹¹), mientras que la mezcla de entrecruzantes simétricos presenta una tendencia a la formación de IPNs¹²⁻¹⁴ ya que MM y VV unen respectivamente cadenas ricas en M y VP.

Con estos antecedentes, este trabajo parte de la hipótesis de que la homología del entrecruzante puede tener cierta influencia en las propiedades de dichas redes anfífilas. Este análisis se ha podido llevar a cabo

gracias a la química de VP descrita en el capítulo uno, que ha permitido preparar los dos entrecruzantes VV y MV alternativos al comercial MM, mostrados en la Figura 2.

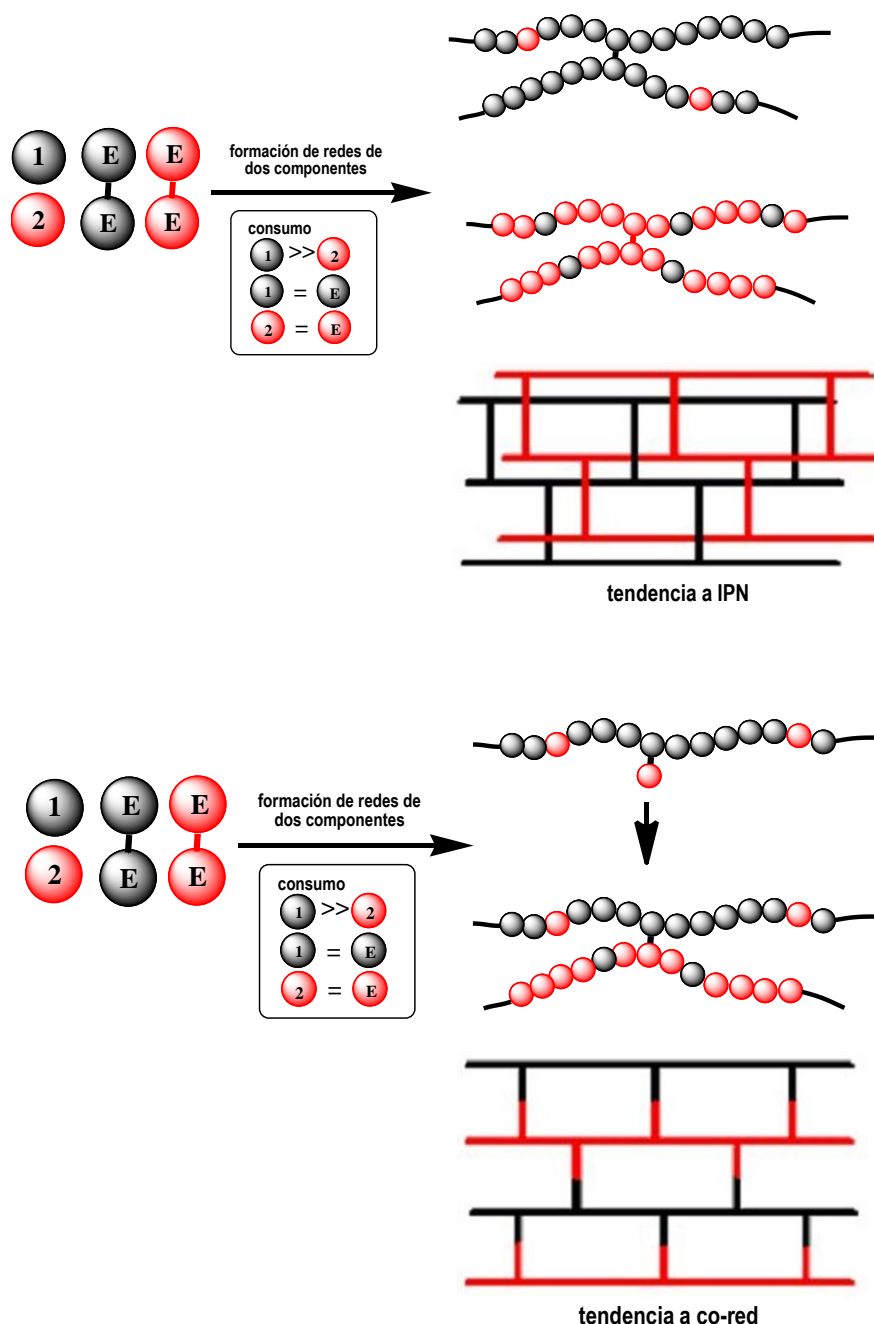


Figura 3. Esquema simplificado de la tendencia de las topologías hacia IPNs o co-red en redes de dos componentes cuando se copolimerizan ambos componentes en presencia de mezcla de entrecruzantes simétricos o asimétricos homólogos respectivamente.

Capítulo 6

Las redes se han preparado en un solo paso mediante fotopolimerización en masa. Se han preparado dos grupos de redes con entrecruzamientos del 1 y 6% molar de entrecruzante (con respecto al total de monómero). Posteriormente se han funcionalizado estas redes anfílicas con grupos sulfonato mediante la incorporación de V_s (homólogo al componente VP), y se ha estudiado su conductividad en hinchado en agua. Por problemas de solubilidad de V_s , sólo ha sido posible preparar redes funcionalizadas VP-MBu. Las redes portadoras de estos grupos SO_3Li se comportarán como polielectrolitos en los que el grupo sulfonato está anclado a la red y el contraión Li está libre y puede difundir a través de la red proporcionando carácter conductor.

2-Experimental:

2.1. Reactivos

La vinilpirrolidona (VP), el butilmetacrilato (MBu) y el dodecilmecrilato (MDo) de Aldrich, se destilaron a presión reducida y se conservaron a 4°C. La V_s y los entrecruzantes VV y MV se sintetizaron como se describe en el capítulo uno. El EGDMA (MM) y el 1-hidroxil ciclohexil fenil cetona (HCPK) de Aldrich, así como el resto de reactivos y disolventes se emplearon sin purificación extra.

2.2. Fotopolimerizaciones

Las redes se sintetizaron por fotopolimerización radical convencional en masa, polimerizando y entrecruzando con iniciación UV. Se mezclaron los monómeros VP y el metacrilato seleccionado (MBu o MDo) en una relación de volúmenes 1:1 y en el caso de las redes con V_s se substituyó el porcentaje deseado (2, 5 o 10% en moles) de VP por V_s . Se añadió un 1 o 6 % molar frente al total de monómero del entrecruzante seleccionado y el iniciador 1-hidroxil ciclohexil fenilcetona, HCPK (0,5% en peso). Se añadió la mínima cantidad de agua (15 μ L como máximo) cuando fue necesario para solubilizar V_s . Se burbujeó nitrógeno en la disolución durante 20 minutos para desplazar el oxígeno en disolución. La disolución se introdujo mediante una jeringa en un dispositivo de fabricación propia formado por dos placas de polipropileno con un espaciador de silicona de 0.4 cm. Se llevó a cabo la polimerización por irradiación de luz UV a 365nm durante 40 minutos con una lámpara UVP ultraviolet crosslinker modelo CL-1000L de 230V. Redes sin tratar fueron usadas para el análisis de las fracciones extraíbles (ver apartado siguiente). Las redes usadas en el resto del estudio fueron hinchadas y lavadas con agua para extraer los precursores que no han reaccionado.

2.3. Análisis de extraíbles (monómero residual y fracción sol)

La cantidad y tipo de monómero residual y de fracción sol se determinaron extrayendo las redes en $CDCl_3$ y analizando la composición del extracto por 1H -RMN. Al medio se añadió un patrón de 5 μ L de hexametildisiloxano (HMDSO) para llevar a cabo un análisis cuantitativo (las redes se pesaron antes de la extracción). La cuantificación se llevó a cabo a través de la medida de la intensidad de las integrales de las unidades de protón referidas a la integral de la señal del HMDSO a 0.5 ppm (correspondiente 5 μ L-0.42 mmoles de protones). El análisis se llevó a cabo como se describe en la sección de Resultados y Discusión.

La cantidad de monómero residual así como la higroscopia de las redes se determinó además de manera cualitativa por análisis termogravimétrico (TGA).

2.4. Hinchamiento

La ganancia o hinchamiento en agua de las redes se determinó gravimétricamente pesando por triplicado las muestras hinchadas en agua y deshinchadas de acuerdo a la ecuación 1:

$$\% \text{hinchamiento} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} 100 \text{ (1)}$$

2.5. Equipos

Los espectros de ^1H -RMN se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 en CDCl_3 con TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala δ relativos a TMS.

Los ensayos termogravimétricos se realizaron en un equipo TA-Q500 de TA instruments ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ bajo corriente de nitrógeno a $20\text{mL}/\text{min}$).

Las propiedades mecánicas de las redes se evaluaron por análisis térmico dinamomecánico (DMTA) empleando un equipo METTLER DMA 861e. Mediante el análisis mecanodinámico se mide la naturaleza viscoelástica de un material en función de la temperatura, el tiempo y la frecuencia. La técnica se basa en la aplicación de un esfuerzo (o deformación) sinusoidal que permite determinar las propiedades mecánicas a partir del desfase existente entre el estímulo y la respuesta del material. Los parámetros obtenidos con estas medidas son: módulo de almacenamiento, módulo de pérdidas y tangente del desfase. Las propiedades mecánicas de las redes hinchadas en agua se evaluaron en el mismo equipo a una única temperatura (25°C) para evitar la pérdida de agua absorbida.

Para la determinación de las medidas de conductividad se utilizaron películas de 2 cm de diámetro con espesores variables (entre aproximadamente 450 y 900 micras) de las redes hinchadas en agua. Estas películas fueron insertadas en un dispositivo fabricado en el taller del centro que incorporaba electrodos de acero inoxidable y un control termostático entre 20 y 80°C . Las medidas de impedancia fueron llevadas a cabo utilizando un analizador de impedancias Autolab AUT30FRA2 ECO-CHEMIE- en el intervalo de frecuencias comprendido entre 0.1 y 10^6 Hz y una amplitud de voltaje de 20 mV.

Para estudiar un intervalo más amplio de temperaturas y para comprobar si existían diferencias debidas al tipo de electrodos, las medidas de impedancia se realizaron también usando un aparato Novocontrol GmbH Concept 40 broadband dielectric spectrometer en el intervalo de frecuencias de 10^{-1} – 10^7 Hz a temperaturas at entre -5 and 80°C . Se utilizaron las mismas membranas pero en este caso los electrodos eran de oro, programándose los experimentos en tiempo y temperatura de tal manera que una adecuada reproducibilidad de los resultados fuera obtenida en las diferentes medidas isotérmicas Cabe indicar que los resultados obtenidos fueron muy similares, no observándose diferencias significativas por el hecho de utilizar unos u otros electrodos.

Las medidas de difusión se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance™ 400, equipado con un imán superconductor vertical de boca ancha (89 mm de diámetro) operando a 9.4 T (frecuencia de Larmor del ^7Li : 155.51 MHz). Los resultados de difusión de ^7Li fueron obtenidos a $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ con una sonda de difusión Bruker, Diff60, utilizando pulsos de radiofrecuencia (rf) de 90° con una duración de 11 μs . Además, se empleó una

Capítulo 6

secuencia de espín eco estimulado con gradientes de campo pulsado ("pulsed field gradient, PFG")¹⁵. El tiempo entre los dos primeros pulsos de rf de 90° (tiempo de eco), τ_1 , fue de 3.12 ms. Los coeficientes de difusión aparentes de ^7Li , D , fueron medidos variando la amplitud de los pulsos de gradiente de campo entre 0 y 150 G cm^{-1} . El tiempo de difusión, Δ , y la duración de los pulsos de gradiente, δ , fueron de 60 y 2 ms, respectivamente. El tiempo de repetición de la secuencia de pulsos fue siempre igual a cinco veces el tiempo de relajación longitudinal ("spin-lattice") T_1 del núcleo observado. En estos experimentos, el tiempo total de adquisición varió entre 1 y 8 horas. La reducción de la amplitud del eco en función de la amplitud de gradiente empleada fue registrada hasta, al menos, un 50% de su valor inicial y el coeficiente de difusión fue calculado mediante un ajuste de estos resultados a una función mono-exponencial decreciente. Previamente, el gradiente de campo magnético fue calibrado según se describe en la literatura¹⁶.

Los espectros de RMN de ^7Li correspondientes a membranas completamente hidratadas fueron obtenidos con una sonda de sólidos estándar Bruker ("cross-polarization-magic angle spinning," CP/MAS), de canal doble para rotores de 4 mm de diámetro. Se empleó una secuencia de un solo pulso de rf, cuya duración varió entre 2.0 y 3.0 μs , y el tiempo de repetición fue de 10 s. Las muestras se alojaron en un rotor de 4 mm de zirconita y fueron rotadas, en ángulo mágico, a una frecuencia de 3 kHz. Los espectros de ^7Li fueron referenciados externamente a una disolución acuosa de cloruro de litio 1M. La determinación de los tiempos de relajación longitudinales del ^7Li en las membranas se llevó a cabo utilizando una secuencia de pulsos denominada de inversión-recuperación ($\pi - t_i - \pi/2$).

3-Resultados y discusión:

3.1. Redes anfífilas de metacrilatos y vinilpirrolidona

3.1.1. Descripciones teóricas de las reacciones y de la formación de redes en condiciones 'ideales'

Esta descripción se va a centrar en las redes entrecruzadas al 1%. Usando las fracciones molares iniciales mencionadas anteriormente ($F_{M0} = 0.40$ y 0.27 para los sistemas MBu-VP y MDo-VP respectivamente) y las relaciones de reactividad $r_M=4.35$ y $r_{VP}=0.06$, tomadas de la literatura¹⁷, el programa Copol¹⁸ nos da información de la heterogeneidad composicional producida en la copolimerización (Figura 4):

Hay una heterogeneidad clara, que es diferente para cada sistema debido a las diferencias en alimentación. Estas diferencias en alimentación se deben al diferente peso molecular de los monómeros metacrílicos puesto que, como se ha mencionado antes, se han usado relaciones en volumen 1:1 de los dos monómeros VP y los metacrilatos MBu o MDo para balancear la contribución hidrofílica/hidrofóbica en el sistema final anfílico.

Como se analizó en el capítulo dos en la copolimerización de dos monómeros con reactividad tan diferente como VP y metacrilatos se forman en una única reacción dos tipos principales de especies. Primero se forman cadenas ricas en metacrilato (MBu o MDo), que de forma continua disminuyen en este componente a medida que se consume, de forma que en la etapa final se forman cadenas muy ricas en VP. Para simplificar la discusión, hemos considerado en cada caso la formación de dos especies, C_M y C_V , con cadenas con mayor volumen del componente metacrílico (MBu o MDo) y VP respectivamente. La composición límite de las cadenas de copolímeros que limita las dos especies (indicada en la Figura 4) viene dada por $f_{Mi}=F_{M0}$, es decir, la

correspondiente a aquellas cadenas que balancean la relación 1:1 en volumen elegida en alimentación (f_{Mi} de 0.4 ó 0.27 para los sistemas MBu-VP y MDo-VP respectivamente). De acuerdo a Copol, las conversiones a las que esto ocurre son 0.56 y 0.47 respectivamente (ver Figura 1). Cadenas con $f_M > f_{Mi}$ pertenecerán a C_M mientras que cadenas con $f_M < f_{Mi}$ serán parte de C_V .

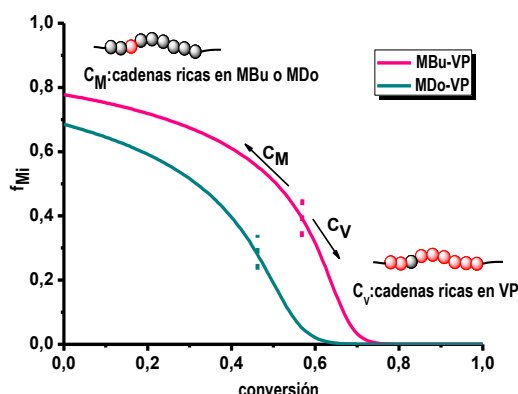
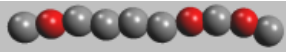
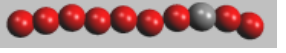


Figura 4: Fracción molar instantánea de M en el copolímero (f_{Mi}) frente a la conversión.

En la Tabla 1 se muestran las características composicionales teóricas para un 100% de conversión de las dos especies, así como otros datos de interés. Se muestran las composiciones promedio de las dos especies (f_{cum} , fracción molar del acumulado de copolímero) así como el reparto de monómeros entre las dos especies (M_{CM} , M_{CV} , VP_{CM} y VP_{CV}), obtenidas mediante un simple ajuste de materia. M_{CM} se refiere a la fracción de M que se ha incorporado a C_M . f_{cumCM} es la fracción molar acumulada de C_M a la conversión límite y viene dado por el programa COPOL. f_{cumCV} se obtiene fácilmente mediante un balance de materia. También se ha calculado, a partir del mencionado balance de materia, la relación en volúmenes de ambas especies (aproximando al volumen y densidad de monómeros). En el Apéndice 2 se muestra un ejemplo de cálculo de estos parámetros recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de C_M y C_V .

		MBu-VP $F_{M0}=0.4$	MDo-VP $F_{M0}=0.27$
Conversión límite		0.56	0.47
C_M, cadenas ricas en M 	f_{McumCM}	0.66	0.54
	M_{CM}	37/40	25/27
	VP_{CM}	19/60	22/73
C_V, cadenas ricas en VP 	$f_{VPcumCV}$	0.93	0.97
	M_{CV}	3/40	2/27
	VP_{CV}	41/60	51/73
Relación en volumen C_M/C_V		1.63	1.45



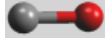
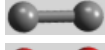
Los datos de la Tabla no se han corregido teniendo en cuenta la variación composicional en F_0 asociada a la incorporación de entrecruzantes, que es pequeña en el caso de usar este 1%.

Capítulo 6

Se observa que, comparativamente, las cadenas ricas en VP (C_V) incorporan poco o muy poco monómero heterólogo (M) mientras que las cadenas ricas en M (C_M) incorporan entre un 27 y un 46 % de VP. Es decir, que mientras que C_V se parece mucho a PVP, C_M es un copolímero con una incorporación significativa de VP. Estas dos tendencias (C_V se parece a PVP y C_M incorpora significativamente VP) se acentúan en MDo-VP, siendo éste sistema el que tiene cadenas C_M con más VP y cadenas C_V más parecidas a PVP homopolímero. Relacionado con esta incorporación significativa de VP a C_M , hay que destacar los valores de relaciones en volumen de ambas especies: C_M es mayoritaria y el exceso disminuye de MBu-VP a MDo-VP de 1.63 a 1.45 en términos de relación en volumen aproximado. En otras palabras, el balance volumétrico inicial 1:1 de monómeros en alimentación no se traduce en un balance equilibrado de C_M y C_V debido a que una parte significativa de VP se ha incorporado a C_M .

A continuación se describen de forma teórica las características de las redes para cada uno de los entrecruzantes, usados al 1% molar con respecto al total de monómeros. Se describen las características de una red formada en condiciones 'ideales', es decir, con 100% de conversión, peso molecular infinito, y que no tiene en cuenta los posibles efectos asociados a segregación, o a difusión de monómeros y cadenas durante la reacción. Aunque la red 'real' será diferente, esta descripción será utilizada como punto de partida para la discusión del estudio de las redes. Usando el desarrollo teórico detallado en el Apéndice 3, se han determinado los valores de grado de polimerización promedio entre nudos (\bar{X}) para las dos especies C_M y C_V , así como las probabilidades de entrecruzamiento (p) en función de los tipos de cadena a unir (C_M - C_M , C_M - C_V ó C_V - C_M , y C_V - C_V), todo ello recogido en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de las redes para cada tipo de entrecruzamiento.

	MBu-VP ($F_{M0}=0.4$) $f_{McumCM}=0.66$, $f_{VPcumCV}=0.93$ fracción en volumen $C_M/C_V=1.63$					MDo-VP ($F_{M0}=0.27$) $f_{McumCM}=0.54$, $f_{VPcumCV}=0.97$ fracción en volumen $C_M/C_V=1.45$				
	\bar{X}_{CM}	\bar{X}_{CV}	p_{CM-CM}	p_{CM-CV^*}	p_{CV-CV}	\bar{X}_{CM}	\bar{X}_{CV}	p_{CM-CM}	p_{CM-CV^*}	p_{CV-CV}
 MM	30	286	0.856	0.139	0.006	25	450	0.857	0.137	0.005
 VV	89	33	0.100	0.433	0.467	81	38	0.091	0.421	0.488
 MV	45	57	0.293	0.656	0.051	38	68	0.279	0.669	0.052
 MM+VV	45	57	0.478	0.286	0.237	38	68	0.474	0.279	0.249

\bar{X}_{CM} y \bar{X}_{CV} son los promedios de número de unidades de cadenas entre nudos, y $p_{C_i-C_j}$ las probabilidades de uniones C_i-C_j , siendo $i, j = M$ (MBu o MDo), VP.* p_{CM-CV} recoge las uniones $C_M-C_V + C_V-C_M$ (ver apéndice 2).

Se observa que existen claras diferencias asociadas al cambio de entrecruzante. En general, el entrecruzamiento es más homogéneo en términos de \bar{X} (\bar{X} parecidos en C_M y en C_V) para los sistemas

entrecruzados con MV y con mezcla (MM+MV). En estos dos casos, el alejamiento de la homogeneidad en densidad de entrecruzamiento se debe a que F_{M0} es menor de 0.5, es decir, a que la relación de monómeros en alimentación es equivolumétrica y no equimolar. Una relación equimolar ($F_{M0}=0.5$) sí daría unos valores de \dot{X} homogéneos durante toda la reacción; en este caso de 1% de entrecruzante se obtendría $\dot{X}_{CM}=50$ y $\dot{X}_{CV}=50$. Por este motivo el sistema MDo-VP es más heterogéneo en estos dos casos (uso de MV o uso de mezcla MM + VV) que el sistema MBu-VP ya que la estequiometría molar inicial se aleja más de 1 ($VP/MDo=2.3$ mientras que $VP/MBu=1.5$).

Existen puntos comunes a los dos sistemas. Como se ha descrito anteriormente, mientras que C_V se parece mucho al homopolímero PVP (especialmente en ese sistema MDo-VP), C_M está formado por copolímeros con fracciones molares de hasta 0.46 de VP (en el caso de MDo-VP). Ello hace que el entrecruzamiento con VV sea mucho menos heterogéneo que con MM, y que en el caso de uso de VV la probabilidad de uniones C_M-C_V sea parecida a la de uniones C_V-C_V . Otras diferencias de esta predicción teórica se analizarán de manera más detallada en el siguiente apartado al estudiar las características de las redes reales.

A continuación se compara esta predicción teórica con los datos reales, y se usa esta comparativa para profundizar en el significado de estas predicciones.

3.1.2. Caracterización de las redes reales: Extraíbles (monómero residual y fracción sol)

La caracterización de los componentes que no se han incorporado a las redes se ha llevado a cabo mediante extracción de las mismas con $CDCl_3$. En la Figura 2 se muestran espectros representativos de este estudio. En primer lugar se observa que el progreso de la reacción varía para cada sistema. Mientras que – de forma genérica – la polimerización de MDo-VP no presenta apenas monómero residual, el sistema MBu-VP tiene un monómero residual promedio (VP) de aproximadamente un 5% molar. La determinación cuantitativa (ver Tabla 3) se ha llevado a cabo mediante la relación de integrales a 4.2 ppm (2 H de VP) y a 0.5 ppm (patrón de 5 μ L de HMDSO, 0.42 mmoles de protones) empleando la ecuación 2, donde A es el área determinada por MestreNova.

$$mmoles VP \text{ extraídos} = \frac{\frac{A_{4.2}}{2} \cdot 0.42}{A_{0.5}} \quad (2)$$

El porcentaje de monómero residual se ha obtenido dividiendo entre el número total de unidades y monómero VP, que se obtiene fácilmente a partir de la fracción molar inicial (Tabla 1) y del peso de la muestra.

Este hecho debe de relacionarse con el punto vítreo de las polimerizaciones, es decir, la conversión a la que la Tg de la mezcla polímero/monómero alcanza temperatura ambiente (vitricándose el sistema y deteniéndose la difusión y la reacción) que en el caso de MBu-VP parece alcanzarse al 95% de conversión. MDo-VP no parece tener punto vítreo. Estas diferencias están de acuerdo con las diferencias de Tg de los polimetacrilatos correspondientes poliMBu y poliMDo que son de 20 y -50 °C respectivamente.

Esta VP residual hace que, para el sistema MBu-VP, las características teóricas de C_V así como la relación C_M/C_V ya no sean las de la Tabla 1 (las cuales estaban calculadas para un 100% de conversión). Asumiendo un

Capítulo 6

95% de conversión para MBu-VP, el nuevo parámetro teórico composicional de C_V es $f_{VPcumCV}=0.92$ y la relación de volúmenes C_M/C_V aumenta a 1.83.

Además del monómero residual se observan en los espectros picos anchos típicos de polímero. Para cada sistema se observan dos patrones diferentes de picos anchos, uno correspondiente a cadenas ricas en VP y que se obtiene al entrecruzar con MM, y otro correspondiente a cadenas ricas en M y que se obtiene con los otros sistemas aunque en mayor cantidad en el caso de entrecruzamiento con VV. Estas diferencias se pueden observar en la Figura 5 donde se han incluido espectros de los homopolímeros con fines comparativos. Este resultado está de acuerdo con la hipótesis inicial: MM entrecruza mal cadenas heterólogas C_V , mientras que VV entrecruza mal cadenas heterólogas C_M . Por ello, se ha hecho la siguiente aproximación: las cadenas ricas en M observadas en los espectros se han asignado al componente C_M mientras que las ricas en VP al componente C_V . En base a la predicción teórica anterior de la Tabla 1 (corregida teniendo en cuenta el monómero residual en el caso de MBu-VP), se han determinado los porcentajes de fracción sol (ver Tabla 3) usando los siguientes picos o grupos de picos: para cuantificar la cantidad de unidades VP presentes en las cadenas de C_V extraídas se ha usado el área de la señal entre 2.9 y 3.5 ppm (2H de VP); para cuantificar la cantidad de unidades de MBu ó MDo presentes en las cadenas de C_M extraídas se han usado respectivamente las áreas de las señales 0.6 -1.2 (6H de MBu) y 1.2-1.4 (20H de MDo). De nuevo la determinación cuantitativa (Tabla 3) se ha llevado a cabo mediante la relación de dichas áreas con respecto a la de 0.5 ppm, el patrón de 5 μ L de HMDSO (0.42 mmoles de protones) de acuerdo a las ecuaciones 3-5, donde A es el área determinada por MestreNova.

$$mmolesVP \text{ en } C_V(sol) = \frac{\frac{A_{2.9-3.5}}{2} 0.42}{A_{0.5}} \quad (3)$$

$$mmolesMBu \text{ en } C_M(sol) = \frac{\frac{A_{0.6-1.2}}{6} 0.42}{A_{0.5}} \quad (4)$$

$$mmolesMDo \text{ en } C_M(sol) = \frac{\frac{A_{1.2-1.4}}{20} 0.42}{A_{0.5}} \quad (5)$$

El porcentaje correspondiente de fracción sol, recogido en la Tabla 3, se ha calculado dividiendo el número de unidades calculadas entre el número total de dichas unidades en C_M ó C_V , las cuales se obtienen fácilmente a partir del peso de las muestras y los coeficientes de reparto de la Tabla 1.

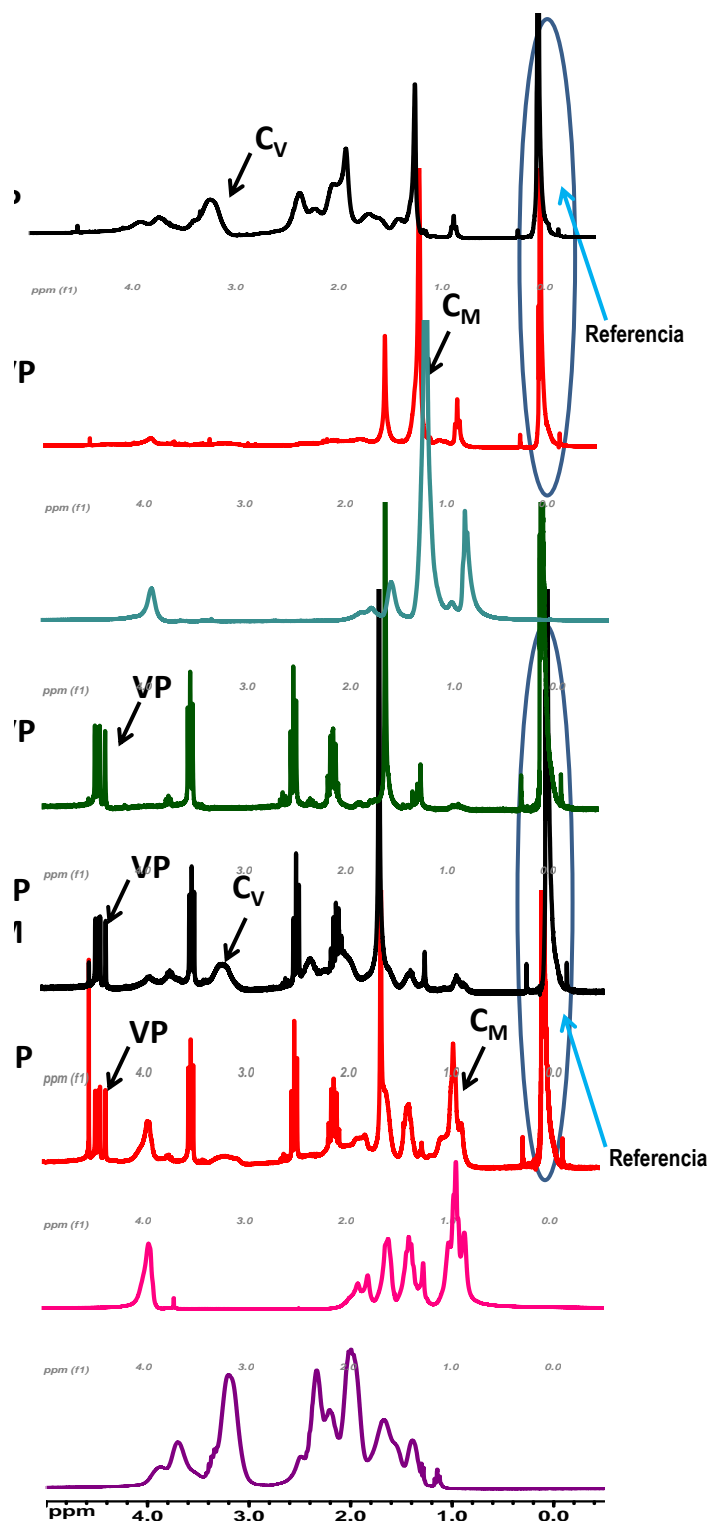










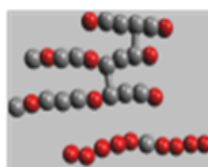
Figura 5: Espectros representativos del estudio de extracción en los sistemas MBu-VP y MDo-VP.

Tabla 3: Resultados del estudio de extracción.

	MBu-VP ($F_{M-0}=0.4$)			MDo-VP ($F_{M-0}=0.27$)		
	Fracción sol		Mon. Res. % ^{b)}	Fracción sol		Mon. Res. % ^{b)}
	C_M , % ^{a)}	C_V , % ^{a)}		C_M , % ^{a)}	C_V , % ^{a)}	
1%						
 MM	n.d.	95	5 (VP)	n.d.	80	<1
 VV	40	n.d.	10 (VP)	50	n.d.	<1
 MV	10	n.d.	5 (VP)	15	n.d.	<1
 MM+VV	15	n.d.	5 (VP)	15	n.d.	<1
6%						
 MM	n.d.	n.d.	5 (VP)	n.d.	20	<1
 VV	n.d.	n.d.	10 (VP)	25	n.d.	<1
 MV	n.d.	n.d.	5 (VP)	10	n.d.	< 5 (VP)
 MM+VV	n.d.	n.d.	5 (VP)	5	n.d.	< 5 (VP)

*n.d.= no detectable. a) % frente al total teórico de C_M ó C_V . b) % frente al total de M+VP. En ambos casos se han redondeado los datos porque estos son aproximados debido al error intrínseco del análisis por RMN asociado al solapamiento de bandas.

Analizando los datos, se confirma el análisis cualitativo anterior (primeras dos filas de datos de la Tabla 3):

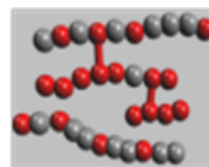


Esquema 1

los entrecruzantes simétricos mono-homólogos al 1% (MM ó VV) entrecruzan mal las cadenas heterólogas (C_V ó C_M respectivamente), de forma que estas cadenas forman parte de la fracción sol (ver espectros de la Figura 5). Esto es así especialmente en el caso del uso de MM al 1%, en el que la gran mayoría de las cadenas ricas en VP (C_V) no forman parte de la red y se extraen con cloroformo. Esta alta proporción de fracción sol tipo C_V está de acuerdo con la predicción teórica inicial (Tabla 2), que daba unos valores de promedio de unidades entre nudos, \bar{X}_{cV} , de varios cientos. En el esquema 1 (Región representativa de la red entrecruzada con MM) se muestra una imagen simplificada de una región de la red representativa para el caso

de uso de MM. MM da lugar a un alto entrecruzamiento de cadenas C_M entre sí (se obtienen las \bar{X}_{CM} más bajas de la Tabla, 2).

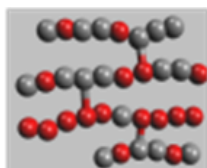
En el caso de las redes al 1% entrecruzadas con VV se observa un porcentaje significativo de cadenas C_M en la fracción sol (40 y 50%), aunque comparativamente menor al tipo C_V obtenido con el uso de MM, lo cual está de acuerdo con el hecho comentado anteriormente de que las cadenas C_M tienen un porcentaje significativo de unidades VP. También está de acuerdo de nuevo con la predicción teórica de la Tabla 2 en la que se observan \bar{X}_{CM} por encima de los valores obtenidos con otros entrecruzantes (81 y 89). Un análisis más detallado de la Tabla 2 nos indica que el uso de VV da lugar a C_V altamente entrecruzadas tanto con cadenas C_M como con C_V . Debido a la significativa presencia de VP en C_M , VV puede entrecruzar de forma efectiva cadenas C_M , e incluso cadenas C_M entre sí, aunque estas cadenas tienen comparativamente pocos puntos de entrecruzamiento y hay pocas uniones homólogas C_M-C_M . Por ello, los posibles dominios ricos en C_M serán inevitablemente pequeños. Como se ha observado en los experimentos de extracción, puede haber cadenas C_M 'libres' (ver esquema 2: Región representativa de la red entrecruzada con VV).



Esquema 2

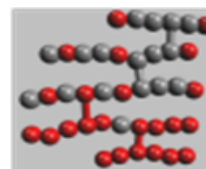
Los otros dos sistemas de entrecruzamiento, uso de asimétrico bi-homólogo (MV) y de mezcla de simétricos (MM+VV), son más eficientes y dan lugar a fracciones sol muy inferiores. Este resultado está también de acuerdo con la predicción teórica, la cual mostraba los mejores datos comparativos de \bar{X} . En ambos casos la fracción sol está compuesta de cadenas C_M a pesar de que los \bar{X}_{CV} teóricos son más altos para las cadenas C_V . Este resultado singular podría estar relacionado con el hecho de que las cadenas C_M , que son las primeras que se forman, podrían formar dominios ricos en C_M antes de que se complete la formación de la red atrapando segundas funcionalidades de los entrecruzantes no accesibles y dando lugar a cadenas C_M 'libres' que participan en la fracción sol.

Los datos teóricos de probabilidades de la Tabla 2 muestran que el uso de MV da lugar a un predominio de uniones heterólogas C_M-C_V (ver esquema 3: Región representativa de la red entrecruzada con MV), es decir, hay una tendencia hacia la formación de coredes estadísticas entre ambas especies. En cualquier caso, debido a la presencia significativa de VP en C_M , también debería haber uniones C_M-C_M . Las uniones C_V-C_V en cambio son muy bajas, debido a que hay muy poco metacrilato (M) en estas cadenas. Debido a este bajo entrecruzamiento C_V-C_V , los posibles dominios ricos en C_V serán pequeños.



Esquema 3

La predicción teórica muestra que el uso de la mezcla MM + VV, comparado con MV, da lugar a un aumento comparativo de uniones homólogas C_M-C_M y C_V-C_V (tendencia hacia la formación de IPNs), aunque hay más de las primeras debido de nuevo a la significativa presencia de VP en C_M que hace que VV pueda entrecruzar de forma efectiva dos cadenas C_M . Por el mismo motivo, también se dan las uniones heterólogas C_M-C_V en cierta extensión. En cualquier caso, se puede considerar que hay una tendencia hacia la formación de IPNs (ver esquema 4: Región representativa de la red entrecruzada con MM + VV).



Esquema 4

Volviendo a la Tabla 3, se observa que un aumento del porcentaje molar de entrecruzante al 6% hace que la fracción sol desaparezca o disminuya. La fracción sol tipo C_V desaparece y en el sistema MBu-VP no hay

Capítulo 6

tampoco fracción sol tipo C_M . En el sistema MDo-VP se observan cadenas C_M 'libres' en menor cantidad que en el caso del 1%. El hecho de nuevo de que se extraigan solo cadenas C_M , podría estar de acuerdo de nuevo con la formación prematura de dominios ricos en MDo en el que la segunda funcionalidad del entrecruzante ya no es accesible. En este contexto, hay que señalar que el MDo es mucho más voluminoso que el MBu.

Los datos de monómero residual están de acuerdo de forma cualitativa con el análisis de TGA de las membranas sin lavar (Figura 6).

La ampliación de los termogramas de TGA del sistema MBu-VP muestra que estas redes presentan dos pérdidas debidas probablemente a la pequeña cantidad de agua absorbida y al monómero VP sin reaccionar, siendo significativamente mayor la pérdida en VP sin reaccionar en el caso de redes entrecruzadas con VV tanto al 1 como al 6% de entrecruzamiento en concordancia con los datos de la Tabla 3. En el sistema MDo-VP aparece en TGA una pérdida más apreciable de agua, parece que las redes MDo-VP son más higroscópicas que las redes MBu-VP, lo cual está de acuerdo con el mayor porcentaje molar de VP. En estas redes no se observa de forma diferenciada pérdida de monómero residual.

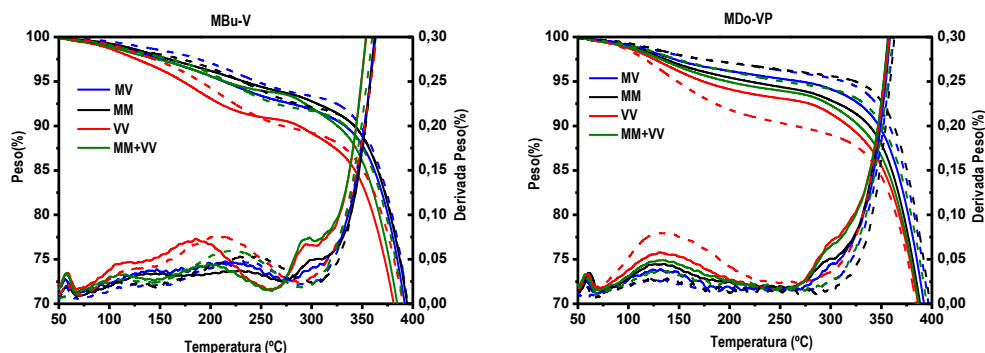


Figura 6: Ampliación de la región inicial de pérdida de peso en los termogramas de TGA. 1% entrecruzante (línea continua), 6% entrecruzante (línea discontinua).

3.1.3. Propiedades Dinamo Mecánicas, DMTA. Consideraciones comunes a los dos sistemas

Las redes se han analizado por DMTA a diferentes frecuencias (1, 3, 10 y 30 Hz). Como se pretenden evaluar las prestaciones de las redes en agua, este estudio se ha llevado a cabo con redes secas pero 'pre-tratadas' en agua durante 48 horas. Este pre-tratamiento puede favorecer la segregación de los dos componentes. Mediante análisis por extracción en $CDCl_3$ similar al mencionado antes, se ha confirmado que este pre-tratamiento corto en tiempo elimina el monómero residual pero no la fracción sol (ni siquiera la hidrofílica C_V). Por tanto, las medidas se han hecho sobre los materiales completos (gel + sol).

En las graficas de DMTA se han representado conjuntamente las variaciones de $tg(\delta)$ y de módulo de almacenamiento (E') a 3 Hz. Se ha añadido a nivel informativo la curva de $tg(\delta)$ a 10 Hz para mostrar que existe un cierto desplazamiento de la curva en función de la frecuencia. En todos los casos, los máximos en $tg(\delta)$ coinciden con caídas del módulo.

Como punto de partida se han analizado redes homopoliméricas de los dos componentes VP y M (MBu y MDo) para tener la referencia de sus Tgs en estas condiciones y para determinar la influencia del entrecruzamiento. En la Figura 7 se muestran las curvas obtenidas por DMTA de la tangente de δ y el logaritmo del módulo de almacenamiento (E') frente a la temperatura para los homopolímeros de los dos sistemas MBu-VP (homopolímeros PVP y PMBu) y MDo-VP (homopolímeros PVP y PMDo) entrecruzados al 1% con el entrecruzante homólogo en cada caso, VV para PVP y MM para PMBu y PMDo.

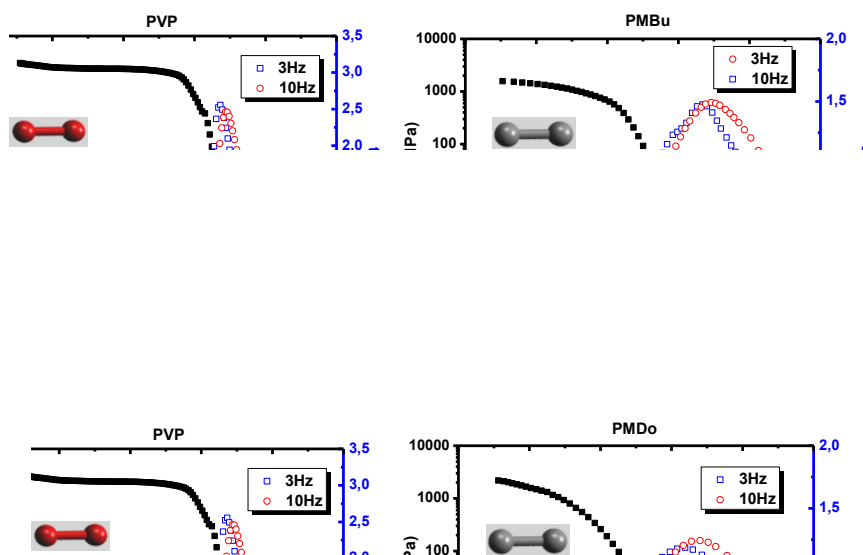


Figura 7: DTMA de los homopolímeros

Considerando el máximo en tangente de δ como la Tg de la red, se puede observar (Tabla 4) que las temperaturas de transición de estas redes de referencia de un componente son superiores a las de las cadenas lineales (T_g PVP¹⁹ = 170°C, T_g PBuM²⁰ = 20°C, T_g PDoM²⁰ = -70°C). El incremento de la Tg en todos los casos debe asignarse al entrecruzamiento efectivo que ejercen los entrecruzantes y a la consiguiente restricción de movilidad de las cadenas.

Tabla 4: Tgs de los homopolímeros PVP, PMBu y PMDo lineales y entrecruzados al 1%.

	PVP Tg (°C)	PMBu Tg (°C)	PMDo Tg (°C)
Red entrecruzada al 1%	185	67	5

Capítulo 6

DMTA del sistema MBu-VP

En la Figura 8 se muestran las curvas obtenidas por DMTA de la tangente de δ y el logaritmo del módulo de almacenamiento (E') frente a la temperatura para las redes obtenidas a partir de los cuatro entrecruzamientos para el sistema MBu-VP (entrecruzadas al 1 y al 6%). Se observa que las muestras entrecruzadas al 1% presentan dos claros máximos en $\text{tg}(\delta)$ a temperaturas que se aproximan a las de las redes puras de referencia. Por ello, y de acuerdo con el análisis teórico, las temperaturas de estos dos máximos se han asignado de forma preliminar a las temperaturas de transición (T_g) de dominios ricos en los dos tipos de cadenas C_M y C_V . En otras palabras, el análisis por DMTA parece indicar que estas redes MBu-VP entrecruzadas al 1% presentan una segregación en dominios ricos en cada uno de los dos componentes. Las redes entrecruzadas al 6% presentan un máximo o dos máximos a temperaturas más próximas entre sí que en el caso de las redes al 1%. Esta diferencia podría ser coherente con una menor movilidad de las diferentes cadenas y una mayor dificultad para segregarse.

Enfocando de nuevo en las redes entrecruzadas al 1% y en su posible segregación en dominios ricos en C_M y C_V , de cara a sustentar esta asignación se ha llevado a cabo un cálculo teórico de T_g s usando la ecuación de Fox (6):

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}} \quad (6)$$

Usando los datos composicionales teóricos globales y de los componentes C_M y C_V (Tabla 1), se han determinado las fracciones en peso (Tabla 5) y se ha aplicado la ecuación de Fox para calcular la T_g global así como las T_g s de cada uno de los dos componentes por separado. Los cálculos y las predicciones se muestran en la Tabla 5. Se han usado como T_{g1} y T_{g2} los datos de las redes homopoliméricas entrecruzadas.

Tabla 5: Fracciones molares y en peso del componente M y T_g de las redes obtenidas mediante la ecuación de Fox.

	f_M fracción molar de M	w_M fracción en peso de M	T_g (°C) Obtenida por Fox
Sistema total	0.4	0.46	121.9
C_M	0.66	0.71	94.4
C_V	0.92	0.90	169.6

C_V se ha corregido teniendo en cuenta el monómero residual (5% molar de VP). f_M (molar) original de 0.07.

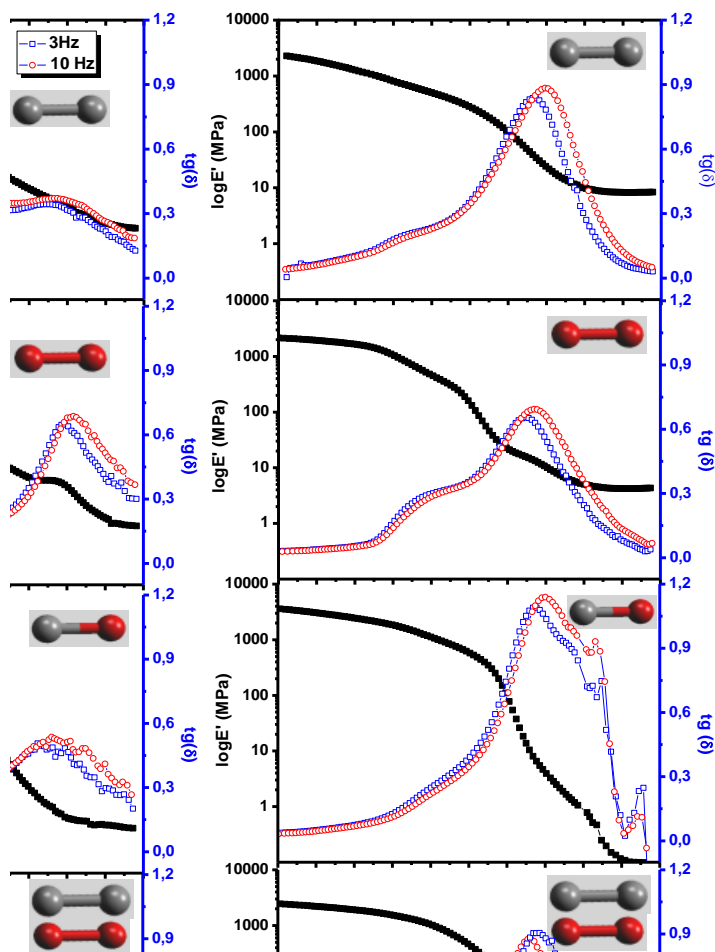


Figura 8: Curvas de DMTA (E' y $\text{tg}(\delta)$) de las redes de dos componentes MBu-VP entrecruzadas al 1% (izquierda) y al 6% (derecha). En el caso de $\text{tg}(\delta)$ se muestran las curvas para las dos frecuencias intermedias de 3 y 10 Hz.

En la Figura 9 se muestran estos datos teóricos junto con los datos experimentales de temperaturas de los máximos de tangente de las redes entrecruzadas al 1%.

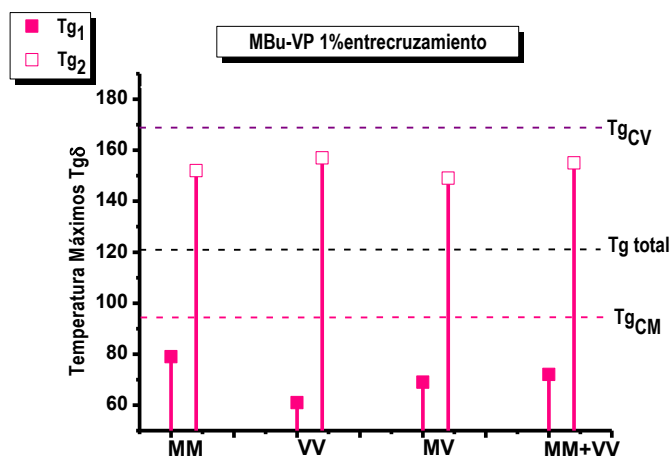


Figura 9: T^a de los dos máximos en tangente δ para cada sistema de entrecruzamiento. Las líneas punteadas indican las Tgs calculadas mediante la ecuación de Fox.

El hecho de que existan dos máximos y de que las temperaturas correspondientes se aproximen a las Tgs teóricas (según Fox) para C_M y C_V parece estar de acuerdo con la existencia de dominios de los dos tipos.

También se puede observar como la primera Tg es superior en el caso del entrecruzante MM puesto que este es homólogo a las cadenas de este dominio (C_M) y al entrecruzar estas cadenas de manera más efectiva hace que se restrinja más su movimiento y por lo tanto aumente su Tg. Al contrario la Tg1 de la red entrecruzada con el compuesto heterólogo VV es la menor. De manera análoga la segunda Tg correspondiente al componente C_V es ligeramente superior en el caso de usar el entrecruzante homólogo VV. Los entrecruzantes MV y mezcla (MM+VV) parecen entrecruzar ambos tipos de cadenas de forma más equilibrada, lo cual está de nuevo de acuerdo con la predicción teórica.

Las formas de las curvas de DMTA muestran una variación muy significativa en función del entrecruzante. Por ello, en la Figura 10 se han representado las alturas de los máximos en tangente de δ . El análisis comparativo de las alturas de cada componente puede relacionarse con la variación en el porcentaje de cadenas de C_M o C_V que participan en la transición.

El empleo de MM comparado con VV hace que las alturas de las tangentes correspondientes a ambos dominios C_M y C_V se inviertan. Parece que en cada caso, el entrecruzante simétrico refuerza la participación de las cadenas homólogas en la transición. Esta diferencia podría estar relacionada con el hecho ya observado de que una fracción alta o muy alta de las cadenas heterólogas no forman parte de la red (son fracción sol). El empleo de la mezcla de MM + VV y sobre todo el uso de MV pondera la participación de ambas cadenas en las transiciones. En ambos casos, como se describió antes, no existe apenas fracción sol.

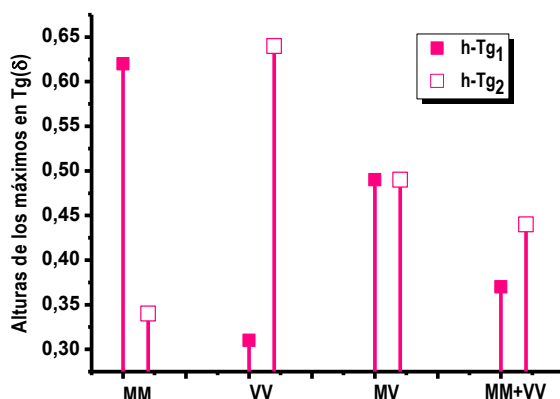


Figura 10: Alturas de los dos máximos en tangente de δ para cada sistema de entrecruzamiento.

Las caídas del módulo son complejas y muestran también una dependencia con el tipo de entrecruzante. Para los sistemas diferentes a MV, después de la primera transición (110 °C), la correspondiente a C_M , se llegan a valores de módulo casi dos órdenes de magnitud inferiores al inicial (ver Figura 11). Siendo la relación en volumen C_M/C_V teórica de 1.63, esta caída está de acuerdo con una dominancia del dominio C_M . Tras la primera transición podemos imaginarnos la red como un componente principal por encima de T_g (C_M) y entrecruzado por dominios duros ricos en C_V . En el caso de MV sin embargo la caída del módulo es mucho menor, casi de un solo orden de magnitud. Este hecho puede explicarse por el alto porcentaje de uniones heterólogas C_M-C_V (ver Tabla 2) que permiten una codominancia de los dos dominios en la red global. Se podría decir que MV entrecruza de forma más eficiente los dos tipos de cadenas.

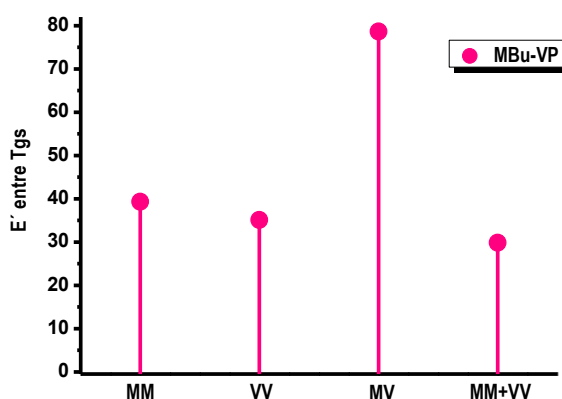


Figura 11: Módulo de almacenamiento (E') a 110°C para los distintos sistemas de entrecruzamiento.

Capítulo 6

En la Figura 12 se ha representado el logaritmo neperiano de la frecuencia frente al inverso de la temperatura ($^{\circ}\text{K}$) para todas las curvas a las cuatro frecuencias estudiadas 1, 3, 10 y 30 Hz. Se ha determinado la energía de activación a partir de estas representaciones mediante el ajuste a la ecuación de Arrhenius (7):

$$\ln F = \left(\frac{-E_a}{R} \right) \frac{1}{T} \quad (7)$$

donde F es la frecuencia, E_a es la energía de activación (KJ), R la constante de los gases ($R = 8.31 \times 10^{-3}$ KJ K/mol) y T la temperatura ($^{\circ}\text{K}$).

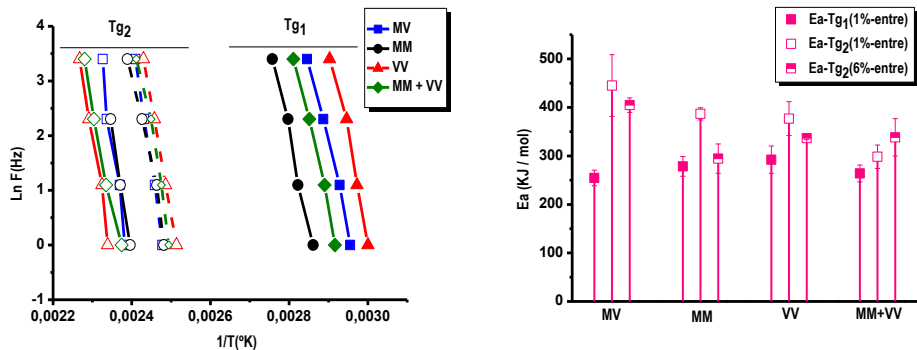


Figura 12: Arriba: \ln de la frecuencia frente al inverso de la temperatura (K^{-1}) correspondiente al máximo de $\text{tg}(\delta)$ para el sistema MBu-VP. 1% entrecruzante (línea continua), 6% entrecruzante (línea discontinua). Abajo: energías de activación (KJ/mol) para los dos máximos en cada sistema de entrecruzamiento.

DMTA del sistema MDo-VP

En la Figura 13 se muestran curvas de DMTA similares a las de la Figura 8 para los cuatro entrecruzamientos del sistema MDo-VP (entrecruzadas al 1 y al 6%). No ha sido posible realizar el ensayo de DMTA entrecruzado al 6% con MM pues la red se quiebra en el proceso de preparación de la muestra. Aunque las curvas son más complejas que en el caso de sistema MBu-VP, de nuevo parece haber segregación en muchas de las redes – incluida alguna entrecruzada al 6%– pues se observan dos máximos en la $\text{tg}(\delta)$ a temperaturas alrededor de 20 y 200 $^{\circ}\text{C}$ (ver Figura 13), que se han asignado de nuevo a las T_g s de dominios ricos en C_M y C_V respectivamente.

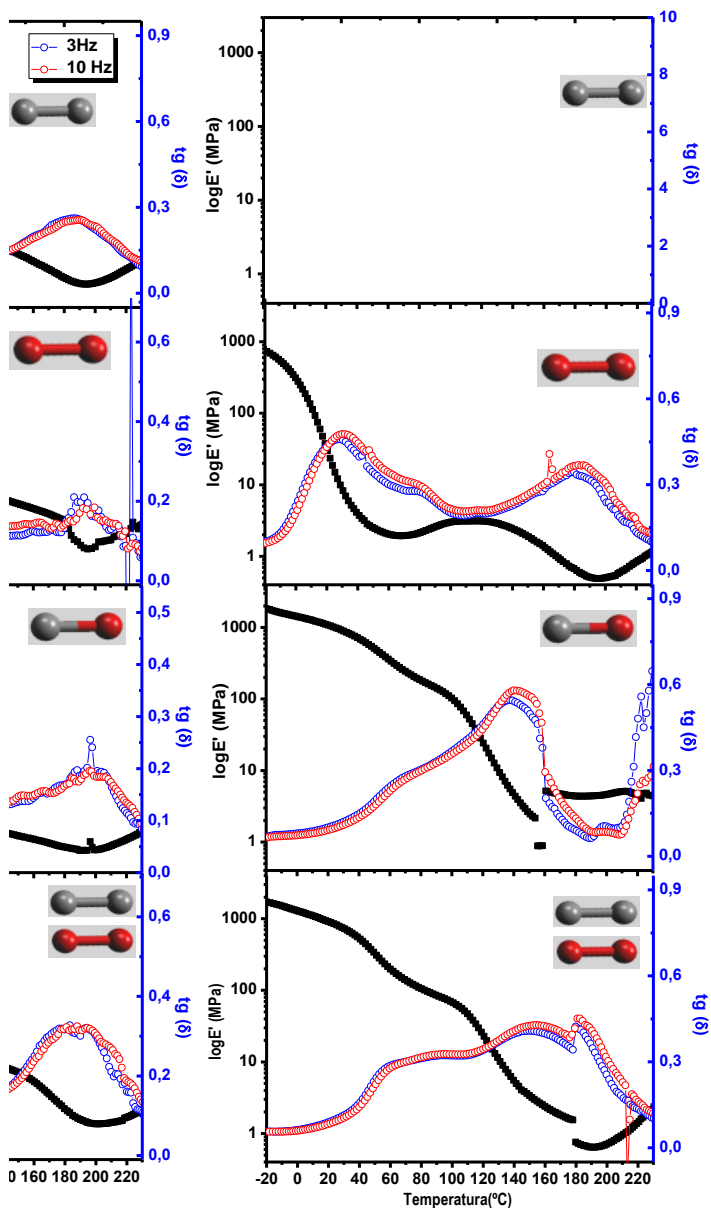


Figura 13: Curvas de DMTA (E' y $tg(\delta)$) de las redes de dos componentes MDV-VP entrecruzadas al 1% (izquierda) y al 6% (derecha). En el caso de $tg(\delta)$ se muestran las curvas para las dos frecuencias intermedias de 3 y 10 Hz. Se muestra la curva del módulo a 3 Hz como ejemplo.

Se ha llevado a cabo una predicción de T_g s similar a la llevada a cabo en el sistema MBu-VP usando la ecuación de Fox, obteniéndose los datos teóricos de la Tabla 6.

Capítulo 6

Tabla 6: Fracciones molares y en peso del componente M y Tg de las redes obtenidas mediante la ecuación de Fox.

	f_M fracción molar de M	w_M fracción en peso de M	T_g (°C) Obtenida por Fox
Sistema total	0.27	0.46	72.3
C_M	0.47	0.73	28.8
C_V	0.97	0.93	163.3

En la Figura 14 se han representado estos datos junto con los puntos experimentales para las redes entrecruzadas al 1%, las temperaturas de los máximos en tangente de δ . De nuevo la aproximación a la predicción de Fox está de acuerdo con una segregación y una formación de dominios ricos en C_M y C_V .

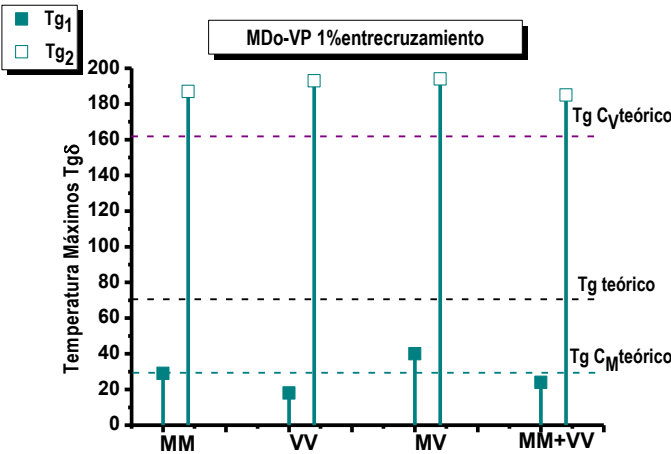


Figura 14: T^a de los dos máximos en tangente δ para cada sistema de entrecruzamiento. Las líneas punteadas indican las Tgs calculadas mediante la ecuación de Fox.

En las curvas de la Figura 13, tanto las variaciones de las tangentes como de los módulos, son mucho más complejas y difíciles de discutir que las del sistema MBu-VP. Por ejemplo, la variación de las curvas de tangente y de las alturas de sus máximos, no siguen la misma tendencia que en el caso anterior, y de hecho son cambios difíciles de racionalizar.

En realidad el sistema MDo-VP presenta diferencias muy relevantes con respecto al sistema anterior MBu-VP. En primer lugar, el balance molar de los dos monómeros está muy alejado de 1 (VP/MDo de 2.3), y por ello, como se analizó previamente, ningún sistema es capaz de entrecruzar de forma homogénea la red. En la Tabla 2 se mostraba como la diferencia entre \dot{X}_{CM} y \dot{X}_{CV} era alta en todos los casos y se alejaba de 50 (el valor de homogeneidad de referencia para el sistema equimolar). De hecho en este sistema, el entrecruzamiento con MV y mezcla MM+VV es similar en términos de densidad de entrecruzamiento al VV. En todo caso, peor que en el sistema MBu-VP. Otra diferencia importante entre los dos sistemas, y que también está asociada a la relación

molar inicial, es el hecho de que el componente C_M en este caso MDo-VP es muy rico en VP ($f_{McumCM}=0.56$). En unidades molares, casi la mitad es VP.

Otro punto que hay que resaltar es que, mientras que en el sistema MBu-VP la T_g del componente C_M era claramente superior a ambiente, en este sistema MDo-VP esta T_g es cercana a ambiente, es decir, cercana a la temperatura de polimerización. Esta diferencia puede ser relevante a la hora de explicar diferencias estructurales. Si nos fijamos en las curvas de DMTA, observamos que en los entrecruzamientos con VV y MV el pico de tangente asociado a C_V es mucho más pequeño que el observado en el sistema MBu-VP, pero al mismo tiempo se observa un hombro o un segundo pico por encima del máximo asignado a dominios ricos en C_M . La mayor movilidad de la primera red (comparada con el sistema MBu-VP) junto con la mayor cantidad de VP presente en C_M , podrían dar lugar a un sistema en el que las cadenas C_V estuviesen más integradas en la red inicial y no participasen en la segunda transición al mismo nivel que el sistema MBu-VP.

En cualquier caso, ante la dificultad de racionalizar estos datos, y la alta heterogeneidad en densidad de entrecruzamiento observada, no se ha profundizado en el análisis de estas curvas de DMTA.

3.1.4. Características en hinchado

La formación de redes con VP y metacrilatos (M) conduce a la formación de redes anfífilas que pueden hincharse en agua. Se ha determinado la ganancia en agua o hinchamiento gravimétricamente de acuerdo a lo descrito en la sección experimental.

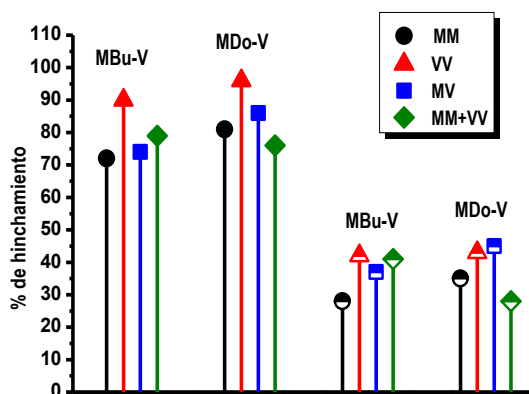


Figura 15: Datos de hinchamiento en agua de todas las redes. Los símbolos rellenos y semirrellenos corresponden respectivamente a los sistemas entrecruzados al 1 y 6%.

En la Figura 15 vemos como las redes entrecruzadas al 1% se hinchan obviamente más que las entrecruzadas al 6%, alcanzando respectivamente valores en torno al 85 y 40 % de media aproximadamente. Para cada grupo (1 ó 6%), la mayoría de las redes presentan hinchamientos cercanos, lo cual indica que la absorción de agua está gobernada principalmente por los promedios globales de entrecruzamiento y de composición. Dentro de esta similitud, hay que destacar que las muestras entrecruzadas con VV son las que más

se hinchan, debido probablemente a que en estas redes hay parte de C_M que no forma parte de la red. Las redes MBu-VP y MDo-VP entrecruzadas con MM, que tienen una gran cantidad de fracción sol C_V (de acuerdo al análisis anterior), presentan sin embargo hinchamientos parecidos a las redes entrecruzadas con MV o con mezcla de MM+VV.

En cualquier caso, se puede decir de forma general, a partir del manejo de las redes en hinchado, que las de los sistemas entrecruzados con MM son las que peores propiedades presentan. De hecho, la red MDo-VP entrecruzada con MM al hincharse en agua se desmenuza. Estas observaciones están relacionadas con los datos obtenidos por DMA en hinchado a 25 °C. En la Figura 16 se muestran los datos comparativos de módulo obtenidos a 3Hz (hay que hacer notar que el eje de ordenadas está en escala logarítmica). En la gráfica de la derecha se muestran los datos comparativos de módulo a 25 °C para las muestras secas, extraídas de los datos de DMTA. Existen diferencias mucho mayores entre las distintas muestras en hinchado que en seco. A pesar de que en la Figura 15 vemos que, para cada sistema, los hinchamientos de las distintas redes son aproximadamente del mismo orden, las diferencias en módulo nos indican que las distintas características de las redes (entrecruzamiento, fases sol, etc.) tienen una gran importancia en sus propiedades en hinchado.

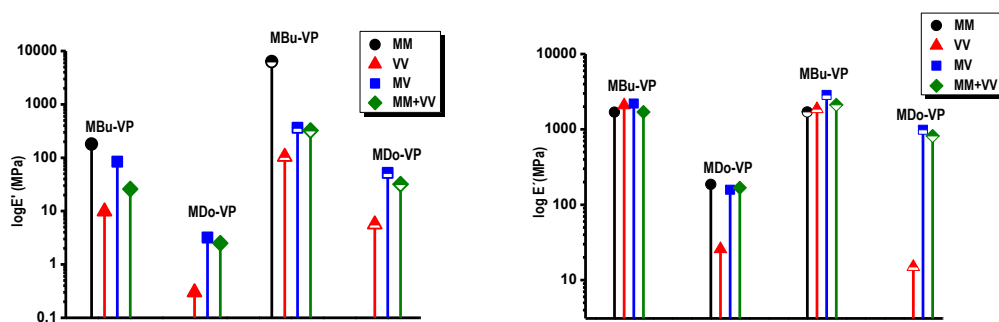


Figura 16. Módulo de almacenamiento a 25 °C extraídos de DMTA a 25 °C para las muestras secas (abajo) y de DMA para las hinchadas en agua (arriba). Los símbolos huecos y rellenos corresponden respectivamente a los sistemas entrecruzados al 1 y 6%.

En hinchado, el agua plastifica los dominios ricos en C_V . Se observa que las redes entrecruzadas con MM son las que tienen mayor módulo en cada grupo de datos (Figura 16). Este hecho está de acuerdo con el mayor entrecruzamiento y la mayor T_g de los dominios ricos en C_M comparado con la T_g de estos dominios para otros entrecruzamientos, así como a la alta fracción sol rica en C_V (en el caso del 1%). No se ha podido llevar a cabo DMA de las redes MDo-VP entrecruzadas con MM por las comentadas malas propiedades. En el sistema MDo-VP el módulo de las redes secas a 25°C corresponde al módulo pasado la primera T_g por lo que el sistema entrecruzado con VV tiene un módulo significativamente más bajo puesto que como se vio en la comparativa de alturas de los máximos de T_g s en este sistema sorprendentemente el mayor dominio era el de las cadenas C_M a pesar de ser el entrecruzante homólogo a C_V .

3.2. Funcionalización de las redes con grupos sulfonato: estudio de conductividad

En la preparación de estas redes funcionalizadas se ha seguido la misma metodología detallada anteriormente. Las redes se han preparado mediante fotopolimerización usando las mismas relaciones molares expuestas anteriormente (MBu-VP, 1:1 v:v) sustituyendo un 2, 5 o 10% molar de VP por Vs. Como se ha descrito en el capítulo 2, VP y Vs (Figura 17) tienen reactividades muy parecidas ($r_{VS}= 0.90$ y $r_{VP}= 1.61$), por lo que se supone que Vs se incorpora a las cadenas de forma análoga a VP y en una cantidad proporcional.

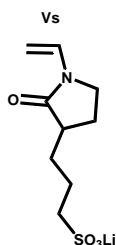


Figura 17: Estructura de Vs

En este apartado se han preparado redes en un solo paso usando los mismos entrecruzantes que en las redes sin funcionalizar, MM, VV MV ó mezcla MM+VV (ver esquema Figura 2). Estos entrecruzantes, como se ha visto, poseen diferente homología de funcionalidad hacia los dos componentes MBu y VP.

Debido a la presencia de dos tipos de dominios en las redes sin sulfonato entrecruzadas al 1%, se ha elegido este porcentaje de entrecruzante para preparar redes con un 2 y 5 % molar de Vs (porcentaje referido a la unidad VP). Con fines comparativos se han preparado dos redes extra entrecruzadas con MV, que como se ha mostrado, es el entrecruzante más efectivo en la formación de uniones heterólogas; en una de ellas se ha usado un 6% de entrecruzante MV y en la otra manteniendo el entrecruzamiento al 1% MV se ha aumentado la carga de sulfonato al 10%.






Para tratar de simplificar y facilitar la comprensión de los resultados a lo largo de todo el capítulo se hará referencia a redes con 2, 5 y 10% de Vs a pesar de que este porcentaje se refiere al porcentaje molar de VP sustituido por Vs.

3.2.1. Caracterización de las redes

De forma similar a como se han caracterizado las redes sin sulfonato, se han analizado las fracciones sol y el monómero residual mediante extracción con cloroformo deuterado (Tabla 7). La tendencia es similar a la observada con las redes sin sulfonato: mientras que MM da lugar a que algunas de las cadenas Cv queden en la fracción sol, VV hace que lo hagan parte de las cadenas tipo Cm. De nuevo MV y la mezcla MM+VV son los entrecruzantes más eficaces.

Estos datos están de acuerdo con lo observado en TGA (Figura 18), donde se aprecian dos pérdidas debidas al agua adsorbida y al monómero residual en el orden de magnitud detectado por RMN.

Tabla 7: Fracciones sol y monómero residual de las redes con Vs analizadas por ¹H-RMN.

MBut-VP ($F_{M-0}=0.4$) $C_M \cdot f_M=0.66$, $C_V \cdot f_{VP}=0.93$, fracción en peso $C_M/C_V=1.48$												
	2% Vs				5% Vs				10% Vs			
	Fracción sol			Mon. Res. % ^{b)}	Fracción sol			Mon. Res. % ^{b)}	Fracción sol			Mon. Res. % ^{b)}
	C_M %	C_V %	$V_S^{a)}$ %		C_M %	C_V %	$V_S^{a)}$ %		C_M %	C_V %	$V_S^{a)}$ %	
1%												
 MM	n.d	10	15	2(VP)	n.d	10	15	<2 (VP)	-	-	-	-
 VV	20	n.d	10	2(VP)	10	n.d	5	2 (VP)	-	-	-	-
 MV	<5	n.d	2	<2 (VP)	<5	n.d	<2	2 (VP)	5	n.d	<5	<2 (VP)
 MM+VV	<5	n.d	2	2(VP)	<5	n.d	<2	<2 (VP)	-	-	-	-
6%												
 MV	n.d	n.d	n.d	<2 (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-

*n.d.= no detectable. En la fracción sol el % C_M , C_V y V_S representan el porcentaje frente al total teórico. % de monómero residual representa el porcentaje residual de cada monómero M ó VP sin reaccionar (En ambos casos se han redondeado los datos porque estos son aproximados debido al error intrínseco del análisis por RMN asociado al solapamiento de bandas). a) Esta columna indica que porcentaje de V_S está en la fracción sol.

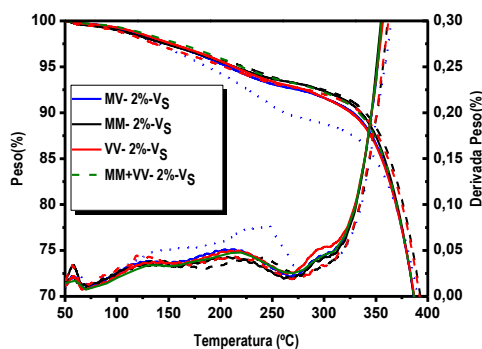


Figura 18: Ampliación de la región inicial de pérdida de peso en los termogramas de TGA. 2, 5 y 10% de Vs línea continua, discontinua y punteada respectivamente.

Las redes secas se analizaron por DMTA; en la Figura 19 muestran los DMTA de las redes entrecruzadas con MV (tomada como ejemplo) al 1 y 6% con un 2% de Vs. Los sistemas tienen un comportamiento similar al de las redes sin Vs. Al igual que con dichas redes sin sulfonato, éstas fueron pre-tratadas en agua y secadas. En DMTA se observan de nuevo dos máximos de $\tan(\delta)$ en las muestras entrecruzadas al 1% y prácticamente un solo máximo en las redes entrecruzadas al 6% debido a lo mucho que se aproximan los dos máximos por efecto del entrecruzamiento. Los valores han sido del mismo orden que en las muestras sin sulfonato. Es decir, al 1% se forman de nuevo dominios ricos en C_M y en C_V .

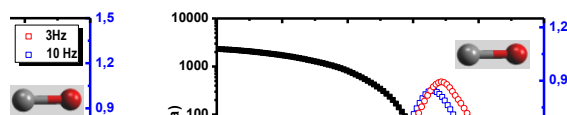


Figura 19: Curvas de DMTA de las redes de dos componentes entrecruzadas con MV (1% izquierda, 6% derecha) con 2% de Vs para dos frecuencias intermedias (3 y 10 Hz).

La incorporación de sulfonato tiene una gran influencia sin embargo en la absorción de agua, como se observa en la Figura 20. Las redes con mayor carga alcanzan hinchamientos superiores al 200%.

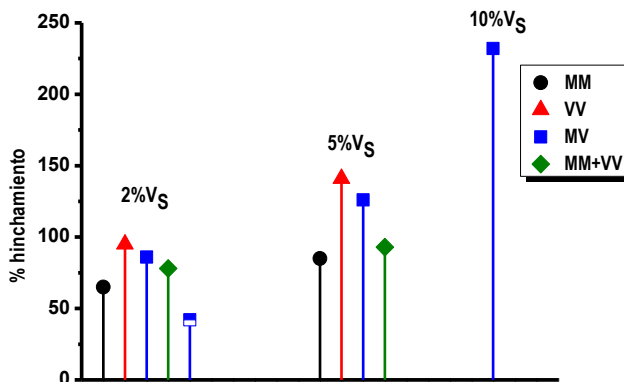


Figura 20: Datos de hinchamiento en agua de las redes funcionalizadas con Vs. Los símbolos rellenos y semirellenos corresponden respectivamente a los sistemas entrecruzados al 1 y 6%.

El análisis por DMA de las redes hinchadas en agua (Figura 21), presenta el mismo perfil que en aquellas sin funcionalizar. En este caso, es destacable que cuanto mayor es la cantidad de modificación menor es el módulo

Capítulo 6

de almacenamiento E' debido al mayor hinchamiento en agua de la red como consecuencia de la alta hidrofilia del grupo SO_3^- .

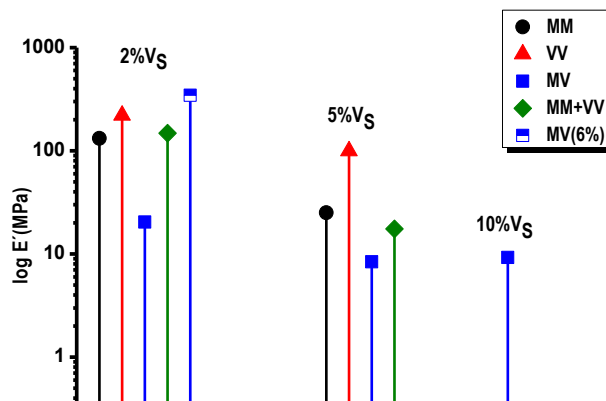


Figura 21: Módulo de almacenamiento por DMA de las muestras con Vs hinchadas en agua. Los símbolos rellenos y semirellenos corresponden respectivamente a los sistemas entrecruzados al 1 y 6%.

3.2.2. Caracterización y Propiedades Dieléctricas de los Polielectrolitos




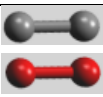

A continuación se detallan los estudios de conductividad de las redes sulfonadas hinchadas en agua. Estas redes son sistemas electrolíticos con grupos ionizados (los sulfonatos) anclados a la red y contraiones (cationes Li^+) libres y capaces de difundir a través de la red. En la Tabla 8 se recogen algunas características de los hidrogeles, como son las fracciones en peso de polímero (w_p) calculadas a partir de los datos de hinchamiento recogidos en la Figura 20, así como las Tgs de los sistemas hinchados obtenidas usando la ecuación de Fox (ec 6) a partir de las Tgs de los dos componentes, agua (135 °K) y redes secas. Como las redes secas mostraron en DMTA dos Tgs que se asignaron a dominios ricos en C_M y C_V , en este cálculo se ha utilizado la Tg del componente hidrófilo (cadenas C_V) ya que es el que va a tener la mayor capacidad de absorción de agua. Estas Tgs de las redes secas se recogen en esta Tabla 8 en °K.

En la Tabla 8 se muestran también las concentraciones de Li (C), en moles/ m^3 , para cada una de las redes, y el espesor en su equilibrio de hinchamiento en agua. El hinchamiento de las redes, con independencia de los dominios C_M y C_V , es isótropo con valores de los espesores de las membranas definidos por la ecuación 8:

$$l_h = l_a \left(\frac{V_h}{V_a} \right)^{1/3} \quad (8)$$

donde l_h y V_h son los espesores y volúmenes de las membranas en su equilibrio de hinchamiento y l_a y V_a los valores correspondientes en las redes secas.

Tabla 8. Fracción en peso de polímero, temperaturas de transición vítrea (T_g) de las membranas secas e hinchadas en agua, espesor de las redes en hinchado y concentración de Li para los distintos sistemas de entrecruzamiento y porcentajes de Vs.

Entrecruzante	%Vs	W _p Polímero	T _{gp} (°K) Redes no hidratadas	T _{gh} (°K) Redes hinchadas en agua	Concentración (moles/m ³)	Espesor (l _n) Redes hinchadas en agua (μm)
1%						
 MM	2	0,61	422	230	54,8	570
	5	0,72	422	266	165,9	660
 VV	2	0,51	430	208	50,2	590
	5	0,42	430	189	98,7	509
 MV	2	0,54	422	213	53,7	457
	5	0,45	422	194	105,5	555
	10	0,31	422	171	139,6	889
 MM+VV	2	0,56	428	219	55,3	616
	5	0,52	428	210	126,8	599
6%						
 MV	2	0,70	406	255	71.73	542,2

*Los moles de Li por m³ se calculan a partir de los datos de la tabla del apéndice 4.

La conductividad eléctrica viene definida por la facilidad de un determinado material al paso de una corriente eléctrica. En el caso de electrolitos la conducción se produce por el transporte de especies atómicas o moleculares con carga eléctrica (iones). La conductividad (σ) de un material, con geometría uniforme, espesor l y sección S , sometido a una corriente eléctrica de intensidad constante viene expresada por la ecuación (9)

$$\sigma = \frac{1}{R} \frac{l}{S} \quad (9)$$

donde R es la resistencia eléctrica. Las unidades de σ en el sistema internacional son Ohmios⁻¹/m o más comúnmente Siemens/m. Diferentes dispositivos son utilizados para la medida de R tanto en corriente continua como alterna. Las medidas en corriente alterna son más utilizadas habitualmente porque además suministran una gran información sobre la respuesta de un material bajo la influencia de un campo eléctrico a diferentes voltajes y frecuencias. Para corriente alterna es conveniente introducir la magnitud compleja, impedancia (Z^*) que

Capítulo 6

es la oposición de un circuito al paso de la corriente eléctrica y viene expresada por la relación compleja entre el voltaje (V) y la intensidad (I) en un circuito de corriente alterna (ecuaciones 10-13):

$$V = IZ = IZe^{j\theta} = I(R + jX) \quad (10)$$

$$Z^* = Z' - jZ'' = R + jX \quad (11)$$

$$\theta = \arctang\left(\frac{X}{R}\right) \quad (12)$$

$$\omega = 2\pi f \quad (13)$$

donde Z es el módulo de la impedancia, Z' y Z'' las componentes real e imaginaria de la impedancia, R es la resistencia del circuito, X, es la reactancia, que puede ser capacitiva o inductiva, θ es el factor de fase, f es la frecuencia en Hz y ω es la frecuencia angular del voltaje.

El módulo de la impedancia actúa de forma similar a una resistencia y el factor de fase indica que hay un desfase θ entre el voltaje y la intensidad de corriente que en el dominio de tiempos equivaldría a que la señal de la corriente estaría desplazada $\theta/2\pi$ con respecto a la señal de voltaje. Las reactancias inductiva y capacitiva pueden ser determinadas fácilmente a partir de las definiciones de inductancia y capacitancia y considerando que tanto el voltaje aplicado como la intensidad de corriente son funciones sinusoidales obteniéndose las siguientes ecuaciones 14:

$$X_C = \frac{-j}{\omega C} \quad y \quad X_L = j\omega L \quad (14)$$

donde C y L, son respectivamente la capacidad del condensador y L la autoinducción del circuito.

Impedancia de los polielectrolitos

Un electrolito es un sistema electroquímico simple que puede ser considerado equivalente a un circuito eléctrico constituido por una resistencia y un condensador en paralelo. En el caso ideal, la representación en el plano complejo de la parte imaginaria de la impedancia (Z'') en función de la parte real (Z') (diagrama de Nyquist) debe dar un semicírculo de diámetro R y centro (R/2,0). En la mayor parte de los electrolitos no se observa esta idealidad y entonces se recurre frecuentemente a un circuito equivalente constituido por una resistencia en paralelo con el denominado elemento de fase constante (CPE por sus siglas en inglés). El alejamiento de la idealidad en electrolitos sólidos ha sido atribuido a múltiples causas, tales como rugosidad de los electrodos, espesor irregular y morfología de la superficie.

En la Figura 22 se muestran los diagramas de Nyquist correspondientes a dos polielectrolitos entrecruzados con MV y con cantidades crecientes de V_s (5 y 10%) a diferentes temperaturas y donde puede observarse que la variación de la parte imaginaria de la impedancia con su parte real en la zona de alta frecuencia es un semicírculo cuyo centro no está situado en el eje de abscisas. En la zona de bajas frecuencias dicha variación es

una línea continua ascendente y que es debida a difusión iónica y a polarización de los electrodos. Ello indica que el comportamiento de estos electrolitos no es ideal y por tanto los resultados experimentales para los polielectrolitos serán analizados a altas frecuencias mediante consideración del circuito equivalente (R y CPE). La zona de bajas frecuencias podría también ser tratada como otro CPE, pero la información que se obtiene es innecesaria para los objetivos de esta tesis.

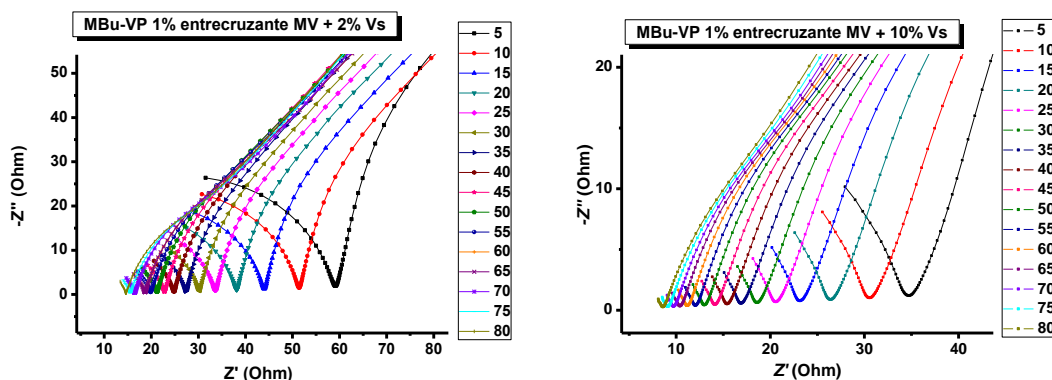


Figura 22: Diagramas de Nyquist correspondientes a los polielectrolitos formados por el sistema MBu-VP con 5% y 10% de Vs (izquierda y derecha respectivamente) entrecruzados con un 1% de MV a temperaturas entre 5 y 80°C.

El circuito eléctrico que describe el comportamiento de estos electrolitos bajo la acción de un potencial eléctrico sería por tanto el indicado en el esquema de la Figura 23:

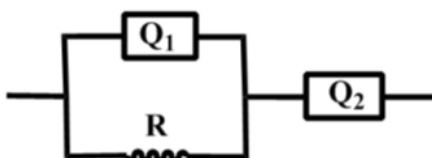


Figura 23: Esquema del circuito eléctrico

Q1 y Q2 representan los dos CPE indicados anteriormente. La impedancia del circuito en la zona de altas frecuencias vendría dada por la ecuación 15:

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + \frac{1}{Z_{Q1}} \quad (15)$$

donde R es una pura resistencia óhmica y Z_{Q1} es la impedancia del CPE que viene dada por :

$$Z_{Q1} = \frac{Q_1^{-1}}{(j\omega)^n} \quad (16)$$

Q_1 es un parámetro que caracteriza al CPE y cuyas unidades son Faradios s^{n-1} y n es un exponente menor que la unidad y que representa la desviación de la idealidad del electrolito, Cuando $n=1$ la impedancia del CPE

Capítulo 6

sería obviamente la de un condensador puro, y Q_1 sería su capacidad, mientras que para valores inferiores la capacidad real del condensador podría considerarse equivalente a:

$$C = (R^{1-n} Q_1)^{1/n} = Q_1 (\omega_r^{-n-1}) \quad (17)$$

donde ω_r es la llamada frecuencia angular de relajación que se analizará posteriormente y para la cual el valor de $-Z''$ es máximo en el diagrama de Nyquist.

De las ecuaciones (15) y (16) se deducen las expresiones para los valores de las partes real e imaginaria de la impedancia, obteniéndose:

$$Z' = \frac{R(1 + RQ_1\omega^n \cos(n\pi/2))}{1 + 2RQ_1\omega^n \cos(n\pi/2) + (RQ_1\omega^n)^2} \quad (18)$$

$$Z'' = \frac{R^2 Q_1 \omega^n \sin(n\pi/2)}{1 + 2RQ_1\omega^n \cos(n\pi/2) + (RQ_1\omega^n)^2} \quad (19)$$

El análisis mediante ajuste no-lineal de los datos experimentales con arreglo a estas ecuaciones ha permitido la obtención de los valores de los diferentes parámetros y magnitudes de interés. A título de ejemplo, en la Figura 24 se representan los valores de Z' y Z'' en función de la frecuencia para el polielectrolito formado por el sistema MBu-VP con 2% de V_s entrecruzado con un 6% de MV a una temperatura de 5°C, junto con las curvas determinadas por este ajuste.

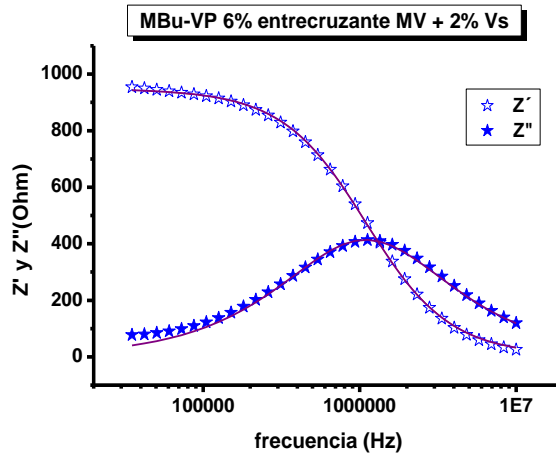


Figura 24: Variación con la frecuencia de las partes real e imaginaria de la impedancia para el polielectrolito formado por el sistema MBu-VP con 2% de V_s entrecruzado con un 6% de MV en agua a una temperatura de 5°C. Las líneas continuas corresponden a valores obtenidos por ajuste no lineal a las ecuaciones 18 y 19.

La Figura 25 muestra el diagrama de Nyquist correspondiente a este experimento junto con los determinados considerando la idealidad o no del electrolito. Puede observarse la casi perfecta adecuación al modelo del CPE. No obstante, el polielectrolito se comporta de forma muy próxima a la idealidad (semicírculo verde), como también indica el valor de $n=0.91$ obtenido en el ajuste no lineal.

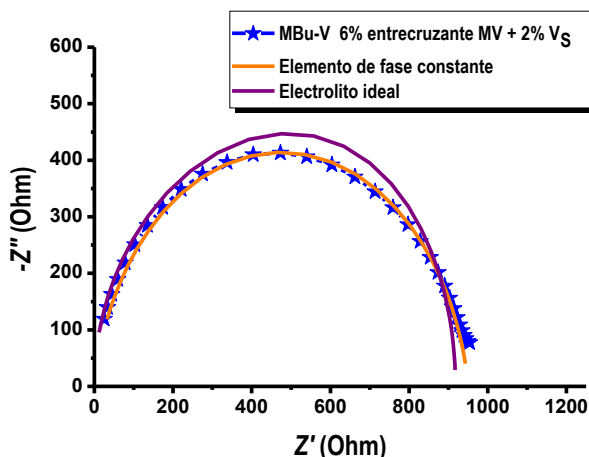


Figura 25: Diagrama de Nyquist en la zona de altas frecuencias y a una temperatura de 5°C para el polielectrolito hidratado formado por el sistema MBu-VP con 2% de Vs y entrecruzado con un 6% de entrecruzante MV. Valores experimentales (cuadrados verdes). Valores calculados considerando un electrolito ideal (semicírculo morado) o real (semicírculo naranja).

Los ajustes no lineales de los datos de impedancia correspondientes a los distintos polielectrolitos y a diferentes temperaturas han sido realizados de forma similar a la indicada y los resultados obtenidos ponen nuevamente de manifiesto que prácticamente todos los polielectrolitos se comportan de forma casi ideal, con valores de n comprendidos entre 0.8 y 0.91. Dichos resultados no han sido incorporados al texto por no aportar información adicional a la ya indicada.

Del análisis en la forma descrita de los diagramas de Nyquist correspondientes a los polielectrolitos estudiados se han obtenido directamente los valores de Z' en el mínimo de $-Z''$ que son equivalentes a las resistencias de los polielectrolitos al paso de la corriente. Con dichos valores se han determinado las conductividades mediante el uso de la ecuación 9 que son equivalentes a las que se obtendrían en corriente continua.

En los diagramas de Nyquist antes mencionados, existe una frecuencia característica ω_r , llamada frecuencia de relajación, que corresponde a aquella en la cual el valor de $-Z''$ es máximo en la zona de altas frecuencias y que es la única que satisface la relación: $\omega_r RC=1$. Efectivamente el producto de estas tres magnitudes da un valor muy próximo a la unidad cuando se utilizan los valores R y C , determinados como se indicaba anteriormente al considerar los polielectrolitos como circuitos constituidos por elementos de fase constante.

Por otro lado, la frecuencia de relajación debe ser considerada como la relación entre la conductividad eléctrica a frecuencia cero y la permitividad dieléctrica relativa del material (ϵ_r):

$$\omega_r = \frac{\sigma}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (20)$$

donde ϵ_0 es la permitividad dieléctrica del vacío, cuyo valor es $8.854 \cdot 10^{-12}$ Faradios/m.

Capítulo 6

Más adelante se analizará la importancia de ω y su relación con la frecuencia en el máximo del módulo dieléctrico.

Permitividad dieléctrica y conductividad.

La permitividad dieléctrica es una magnitud compleja que viene dada por:

$$\varepsilon = \varepsilon' - j\varepsilon'' = \varepsilon' - j \frac{\sigma'}{\varepsilon_0 \omega} \quad (21)$$

y que depende de la frecuencia. Sus componentes real e imaginaria están directamente relacionadas con la impedancia por las ecuaciones 22 y 23:

$$\varepsilon' = \frac{Z''}{2\pi f \varepsilon_0 Z^2} \frac{l}{A} \quad (22)$$

$$\varepsilon'' = \frac{Z'}{2\pi f \varepsilon_0 Z^2} \frac{l}{A} \quad (23)$$

Las representaciones en escala doble logarítmica de la pérdida dieléctrica frente a la frecuencia para algunos de los polielectrolitos estudiados se muestran en la Figura 26 para una temperatura de 20°C, observándose en un amplio intervalo de frecuencias líneas rectas de pendiente -1 como se indica en la Figura 26. La pendiente -1 refleja claramente la adecuación de los resultados a la ecuación (21) pero solamente en el intervalo de frecuencias donde se obtienen los semicírculos en los diagramas de Nyquist y donde al mismo tiempo el valor de la parte real de la conductividad, como se analizará seguidamente, permanece constante. A bajas frecuencias se observan desviaciones debidas a polarización de electrodos.

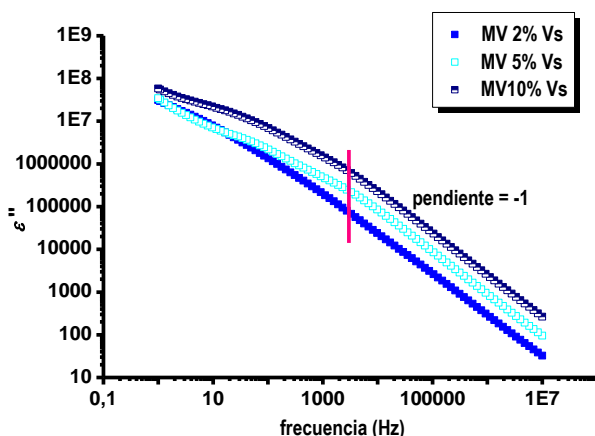


Figura 26: Pérdida dieléctrica (ε'') frente a la frecuencia para los tres polielectrolitos formados por el sistema MBu-VP entrecruzados con MV con cantidades de 2, 5 y 10% de Vs

La conductividad tiene también dos componentes, real e imaginaria (σ' y σ''), que vienen expresadas en función de la permitividad dieléctrica en la forma:

$$\sigma' = \varepsilon_0 \varepsilon'' \omega \quad \sigma'' = \varepsilon_0 \varepsilon' \omega \quad (24)$$

En las gráficas de la Figura 27 se muestra la variación de σ' con la frecuencia para los polielectrolitos, observándose que existe una zona de frecuencias en la que el valor de σ' es casi constante y equivalente a la conductividad real (σ) del sistema que se obtendría en medidas bajo corriente continua. Al mismo tiempo este valor de σ podría obtenerse también mediante la representación de la tangente del ángulo de pérdida:

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (25)$$

y correspondería al valor de σ' donde la $\tan \delta$ presenta su máximo valor. Las gráficas de la Figura 28 muestran estos resultados para los distintos polielectrolitos, observándose en una de ellas la presencia de dos máximos que son atribuidos a heterogeneidad estructural que sería debida a las características intrínsecas al proceso de entrecruzamiento en este polielectrolito. La presencia de estos dos máximos estaría en concordancia con lo observado también en la gráfica de variación de la conductividad real (Figura 27) con la frecuencia, donde no hay una zona nítida en la que σ' sea casi independiente de la frecuencia como ocurre para los otros polielectrolitos.

Una vez determinadas las conductividades de los polielectrolitos por los métodos indicados anteriormente y que conducen a resultados prácticamente idénticos, interesa analizar los valores obtenidos para ver la influencia de la cantidad de comonomero iónico (V_s) y de los entrecruzantes (MM, VV, MV) o de la mezcla (MM+VV) y también de la temperatura. En la tabla 9 se muestran los valores de conductividad que presentan los diferentes polielectrolitos a las temperaturas de 5, 25 y 70°C y la Figura 29 muestra gráficamente la variación de la conductividad para todos los polielectrolitos en todo el intervalo de temperaturas estudiado.

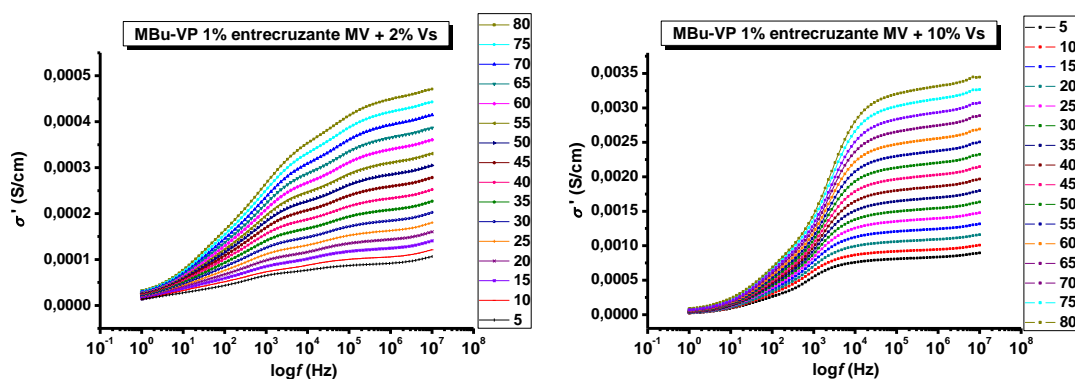


Figura 27: Variación de la conductividad real σ' con la frecuencia para los polielectrolitos formado por el sistema MBu-VP con 2 y 10% de V_s (izquierda y derecha respectivamente) entrecruzados con un 1% de MV a diferentes temperaturas

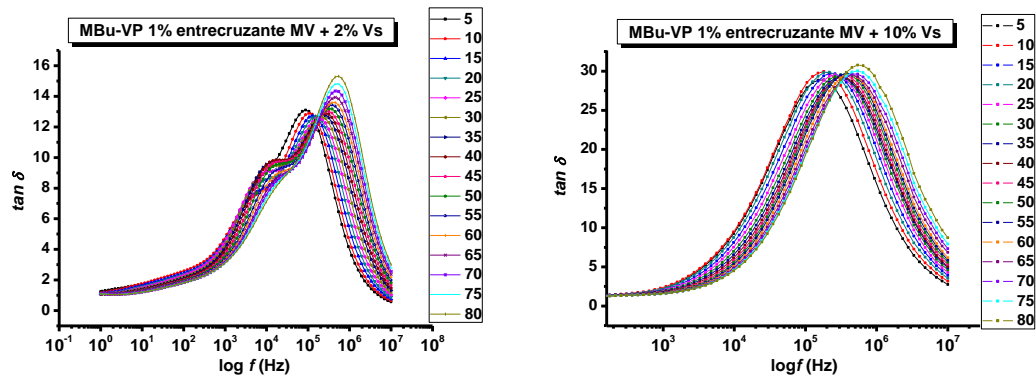







Figura 28: Variación de la tangente del ángulo de pérdida ($\varepsilon''/\varepsilon'$) con la frecuencia para los polielectrolitos formados por el sistema MBu-VP con 2 y 10% de V_s (izquierda y derecha respectivamente) entrecruzados con un 1% de MV a diferentes temperaturas

Tabla 9: Valores de conductividad de los diferentes hidrogeles polielectrolitos a las temperaturas de 5, 25 y 70°C

Entrecruzante	%Vs	$10^5 \sigma$ (S/cm) $T^a=5^\circ\text{C}$	$10^5 \sigma$ (S/cm) $T^a=25^\circ\text{C}$	$10^5 \sigma$ (S/cm) $T^a=70^\circ\text{C}$
1%				
 MM	2	5	11	30
	5	21	36	73
 VV	2	8	15	44
	5	16	27	73
 MV	2	8	15	40
	5	28	49	105
	10	81	131	289
 MM+VV	2	6	12	30
	5	23	41	90
6%				
 MV	2	2	3	9

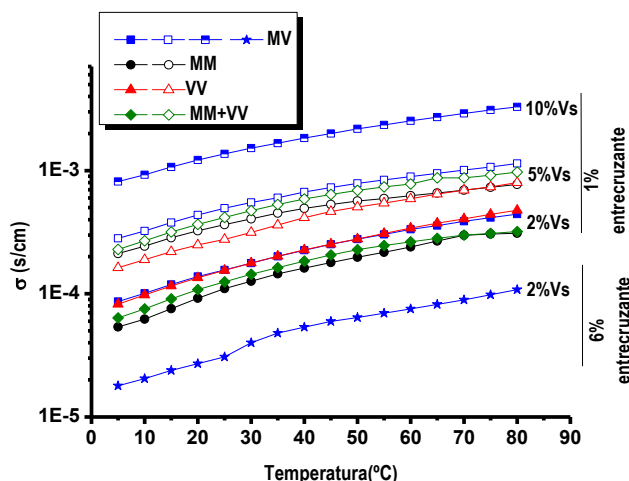


Figura 29: Variación de la conductividad para todos los polielectrolitos en todo el intervalo de temperaturas estudiado.

Un simple análisis de la figura indica una dependencia clara de la carga de sulfonato, aumentando la conductividad para cada temperatura en el orden lógico de 2, 5 y 10% de Vs. También se detecta la notable influencia del grado de entrecruzamiento ya que un aumento del porcentaje de entrecruzante del 1 al 6% hace que disminuya el hinchamiento y también la conductividad (casi un orden de magnitud) como consecuencia no solamente de la disminución de la proporción de agua en el hidrogel, sino también de la disminución de la flexibilidad de las cadenas macromoleculares. Por el contrario, no existe una dependencia aparente del tipo de entrecruzamiento, sea con entrecruzantes homólogos, bihomólogos o mezcla de homólogos. Al parecer sólo la concentración de especies iónicas de sulfonato de litio influye sobre el valor de la conductividad, debido a las características propias del hidrogel que es un medio donde existe una alta movilidad del ion litio.

Los valores de las conductividades a 25°C varían entre 10^{-4} - 10^{-3} S/cm para los polielectrolitos en función del % de Vs que contengan.

La influencia de la temperatura sobre la conductividad sigue las leyes generales para este tipo de materiales cuando las medidas son realizadas por encima de su transición vítrea. En este caso, la ecuación de Vogel-Fulcher-Tamman-Hesse²¹⁻²³ (26) refleja más adecuadamente el cambio de conductividad con la temperatura. Esta función, incorpora una nueva variable T_0 a la típica función de Arrhenius en la forma;

$$\sigma = A \exp \left[-\frac{E}{R(T-T_0)} \right] \quad (26)$$

donde T_0 es la temperatura a la cual la entropía del polielectrolito en el estado vítreo es nula y generalmente tiene un valor 50° por debajo de la temperatura de transición vítrea. La Figura 30 muestra una representación de σ en función de $1/T$ para los polielectrolitos donde las líneas continuas han sido obtenidas por ajuste con arreglo a la ecuación de Vogel, obteniéndose valores de T_0 próximos a 50° por debajo de Tg.

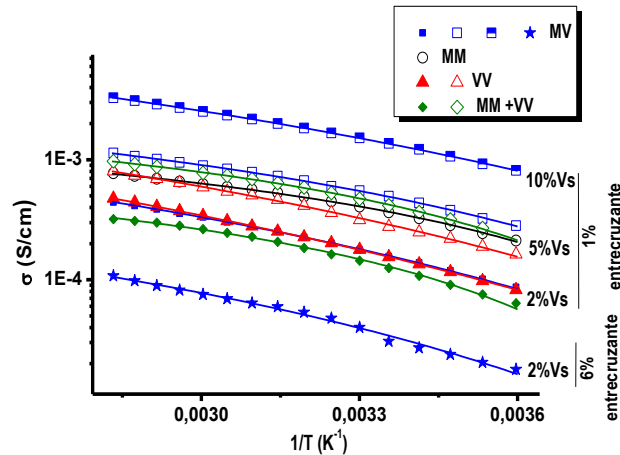


Figura 30: Variación de la conductividad (σ) vs $1/T$ para los polielectrolitos. Las líneas continuas representan el mejor ajuste según la ecuación de Vogel.

Movilidad Iónica y Conductividad

Los datos de espectroscopía dieléctrica también permiten estimar los coeficientes de difusión del Li^+ mediante la determinación de frecuencias características asociadas al movimiento iónico que origina la conductividad. Para ello primero se ha calculado el módulo eléctrico complejo (M^*), que es el inverso de la permitividad dieléctrica compleja, a partir de los datos de permitividad dieléctrica (ϵ) registrados, y cuyas componentes real e imaginaria vienen dadas por:

$$M' = \frac{\epsilon'}{\epsilon'^2 + \epsilon''^2} \quad y \quad M'' = \frac{\epsilon''}{\epsilon'^2 + \epsilon''^2} \quad (27)$$

que también pueden expresarse mediante las ecuaciones :

$$M' = Z'' \omega \epsilon_0 \frac{A}{l} \quad y \quad M'' = Z' \omega \epsilon_0 \frac{A}{l} \quad (28)$$

Desde la introducción de esta magnitud por McCrum y col²⁴ ha existido mucha controversia²⁵ respecto a su utilización para la interpretación y evaluación del comportamiento dieléctrico de materiales ya que unos autores consideran que no es una magnitud adecuada para el estudio del comportamiento dieléctrico (referencias) mientras que otros opinan lo contrario (ref. Ngai). Realmente el módulo eléctrico es especialmente útil para analizar procesos de relajación donde existan fenómenos de polarización de electrodos u otros con importantes efectos capacitivos ya que la parte imaginaria del módulo no se ve afectada por la presencia, por ejemplo, de condensadores en serie. Por ello, se ha considerado conveniente analizar los resultados obtenidos mediante esta magnitud que suministra una gran información sobre el movimiento iónico. En la Figura 25 (izquierda) se muestran los valores del módulo complejo a diferentes temperaturas para el polielectrolito formado por el sistema MBu-VP con 2% de V_s entrecruzado con un 6% de MV, donde se observan máximos a frecuencias tanto

mayores cuanto mayor es la temperatura. Esta frecuencia máxima ω_c se asocia²⁶⁻²⁸ a la velocidad de salto del ion, cuya movilidad iónica μ vendría dada por:

$$\mu = \frac{qD}{kT} = \left(\frac{q}{kT} \frac{d^2 \omega_c}{6} \right) \quad (29)$$

donde d es la distancia del salto (asociada a la distancia de Pauling de aprox. 0,2 nm), D es el coeficiente de difusión del ion, k la constante de Boltzmann y T la temperatura en ° K.

Existe una dificultad en la determinación experimental de ω_c cuando la conductividad es elevada y también a altas temperaturas. En estas condiciones los valores de ω_c suelen ser muy elevados y a no ser que se disponga de aparatos que puedan medir a frecuencias mayores o próximas a gigaherzios, la determinación de ω_c no puede ser llevada a cabo. En la Figura 31 se muestran graficas de M'' frente a la frecuencia para un polielectrolito en el que ha sido posible ver el máximo y también para un sistema donde no ha sido posible determinar la frecuencia crítica ni siquiera a bajas temperaturas.

La frecuencia de relajación ω_r y su relación con ω_c determinan, según ha sido indicado, las características más importantes de un electrolito en lo que respecta a su comportamiento eléctrico. En realidad, para un electrolito ideal, las dos frecuencias deberían ser idénticas de acuerdo con las ecuaciones anteriormente indicadas ya que el producto de $Z'\omega$ que determina el valor de la parte imaginaria del módulo complejo será siempre máximo cuando $-Z''$ tenga su máximo valor en el diagrama de Nyquist. Por ello, se ha considerado que ambas frecuencias, que siempre difieren entre ellas ligeramente, podrían ser utilizadas indistintamente para la determinación del coeficiente de difusión iónico.

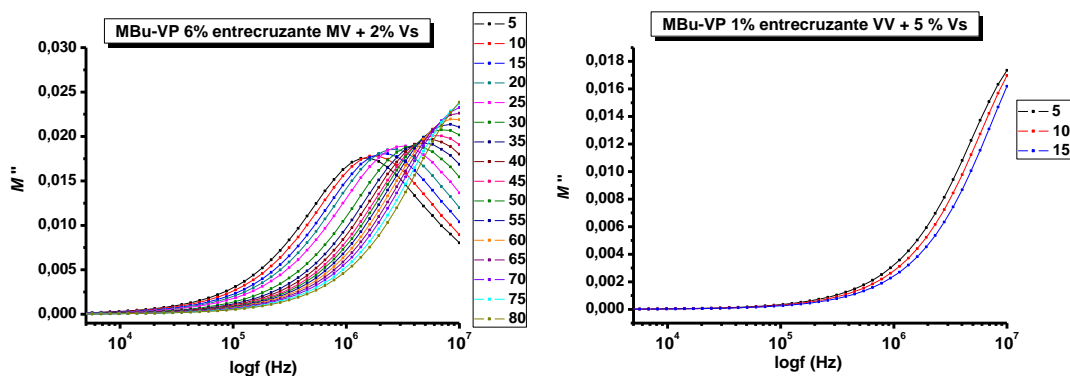


Figura 31. Variación del módulo de pérdida eléctrico con la frecuencia para el polielectrolito formado por el sistema MBu-VP con 2% de Vs entrecruzado con un 6% de MV (izquierda) para el polielectrolito formado por el sistema MBu-VP con 5 % de Vs entrecruzado con un 1% de MV (derecha) para temperaturas comprendidas entre 5 y 80°C.

Una vez determinados los valores de ω_c para los distintos polielectrolitos, se han obtenido los coeficientes de difusión del Li⁺ a varias temperaturas mediante la ecuación 29. En aquellas muestras en las que no haya sido posible la obtención del valor de ω_c a la temperatura deseada, aún es posible determinar un valor aproximado si

Capítulo 6

se dispone de valores de ω_c a otras temperaturas, ya que las frecuencias críticas son directamente proporcionales a las conductividades como indica la ecuación 29 y viene gráficamente expresado en la Figura 32.

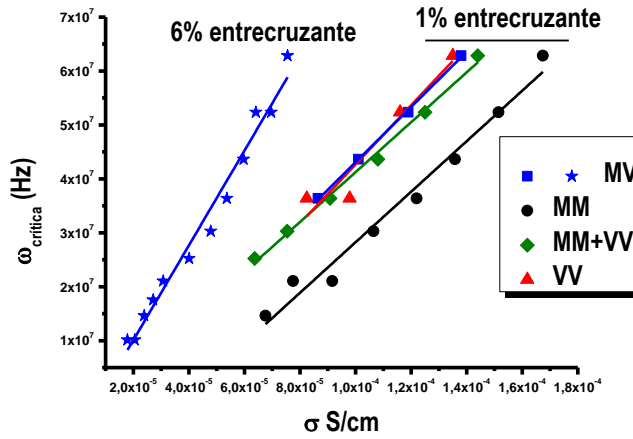


Figura 32: Frecuencia crítica en función de la conductividad para algunos polielectrolitos a diferentes temperaturas

La teoría de Dyre también predice en el mismo sentido un valor de una frecuencia en la cual tiene lugar el paso de la subdifusión a la difusión y que marcaría también la velocidad del salto del ión y que se ha denominado ω_h . Según dicha teoría, la conductividad compleja vendría dada por la relación:

$$\sigma^* = \sigma \left(\frac{j\omega \tau_h}{Ln(j\omega \tau_h)} \right) \quad (30)$$

donde $\tau_h = 1/\omega_h$, equivaldría al tiempo empleado durante un salto iónico y cuyas componentes real e imaginaria serían:

$$\sigma' = \sigma \left(\frac{\omega \tau_c \arctang(\omega \tau_h)}{\frac{1}{4} [Ln(1 + \omega^2 \tau_h^2)]^2 + [\arctang(\omega \tau_h)]^2} \right) \quad (31)$$

$$\sigma'' = \sigma \left(\frac{\omega \tau_c Ln(1 + \omega^2 \tau_h^2)}{\frac{1}{4} [Ln(1 + \omega^2 \tau_h^2)]^2 + [\arctang(\omega \tau_h)]^2} \right) \quad (32)$$

A partir de los datos experimentales se han determinado mediante ajuste no lineal los valores de ω_h , que han sido inferiores a los de ω_r y ω_c obtenidos anteriormente mediante los otros métodos. Esto inclina a pensar que es más conveniente utilizar ω_r para la determinación de los coeficientes de difusión porque además los valores de D así obtenidos son más aproximados a los determinados mediante RMN de Li^7 como se verá en el apartado final.

Por otro lado, es importante retomar los datos experimentales de la variación de la componente real de la conductividad con la frecuencia, donde se ha observado que, excluidas las bajas frecuencias donde existen efectos de polarización, se ve un “plateau” donde la conductividad varía ligeramente con la frecuencia y posteriormente se produce un incremento con la frecuencia, cuya dependencia es en la forma de una función potencial como ha sido establecido por Jonscher²⁹⁻³¹ y universalmente utilizado por los investigadores hasta la época actual³²⁻³³

$$\sigma' = \sigma \left[1 + \left(\frac{\omega}{\omega_j} \right)^\alpha \right] \quad (33)$$

donde ω_j es la frecuencia que marca el inicio de la conducción bajo corriente alterna.

Esta respuesta dieléctrica parece ser universal y ha sido observada en sistemas desordenados tales como vidrios iónicos, electrolitos sólidos y también en líquidos iónicos²⁶ habiéndose identificado ω_c con la velocidad de salto del ion. Estos valores de ω_j pueden servir también para la obtención de los coeficientes de difusión mediante la ecuación 29 y considerando que ω fuera equivalente a ω_c o ω_r , lo que no suele ser el caso, al igual que ocurría anteriormente para los valores de ω_h determinados mediante la teoría de Dyre. La ecuación (33) es la descripción más simple del comportamiento dieléctrico y generalmente no es muy precisa ya que normalmente el exponente α aumenta con la frecuencia y además el valor asintótico a baja frecuencia es inconsistente con los resultados experimentales, debido esencialmente a los problemas indicados de polarización.

En este análisis de los resultados de la conductividad, se ha de tener en cuenta también las investigaciones de Barton³⁴, y Nakijama³⁵⁻³⁶ que hace ya muchos años mostraron que la conductividad iónica en sólidos desordenados venía regida por una ecuación de la forma:

$$\sigma = p \varepsilon_0 \Delta \varepsilon \omega_{BNN} \quad (34)$$

Una ecuación empírica que se conoce con las siglas BNN de los investigadores que verificaron este comportamiento en determinados conductores iónicos³⁷. En esta ecuación, p es una constante próxima a la unidad y $\Delta \varepsilon$ es la diferencia entre la permitividad dieléctrica a baja y alta frecuencia. De nuevo aparece otra frecuencia característica que también es considerada como aquella a la cual se inicia la conducción en corriente alterna.

En la misma línea de investigación para el desarrollo de teorías y aproximaciones que puedan explicar el comportamiento de electrolitos también sería preciso mencionar los excelentes trabajos de investigación realizados por Coelho, Schütt and Gerdes y por Jönsson y colaboradores³⁸⁻⁴¹.

Basados en estas investigaciones, T.M.W.J. Bandara y B.-E. Mellander⁴² han desarrollado nuevas aproximaciones teóricas para determinar la movilidad iónica y la concentración de cargas móviles en electrolitos de muy diversa naturaleza. Las ecuaciones desarrolladas incorporan la ya indicada frecuencia de relajación (ω_r), así como la frecuencia característica en el mínimo de Z'' en el diagrama de Nyquist y su relación con la longitud de Debye tanto para sistemas tipo electrolitos ideales como para sistemas más complejos. Con los datos

Capítulo 6

experimentales de impedancias y permitividades dieléctricas, se ha tratado de obtener resultados que correlacionaran adecuadamente la conductividad experimental con la movilidad iónica determinada por los métodos de Bandara y Mellander, pero los resultados obtenidos no han sido satisfactorios.

Sin embargo, este procedimiento presenta interesantes ventajas respecto a otras aproximaciones que será necesario explorar en el futuro.

Después de lo indicado hasta ahora y sin que ninguna aproximación ofrezca las garantías adecuadas para una determinación precisa de la movilidad iónica, se ha considerado que lo más conveniente es la obtención de los coeficientes de difusión del ion Litio mediante el uso de Resonancia Magnética Nuclear y el posterior cálculo de las conductividades mediante el uso de la ecuación de Einstein (35) que en este estudio sólo contiene el coeficiente de difusión del catión, ya que el anión se encuentra anclado en las cadenas poliméricas y, por tanto, su movilidad es nula.

$$\sigma = \frac{F^2 c}{RT} (D^+ + D^-) = \frac{F^2 c}{RT} D^+ \quad (35)$$

Donde F es la constante de Faraday y c es la concentración de iones Litio, expresada en moles/m³, con R la constante de los gases en el sistema internacional y D en m²/s, para obtener finalmente σ en Siemens/m.

Coefficientes de difusión por RMN (⁷Li) de membranas de polielectrolitos en medio acuoso

Se han determinado los coeficientes de difusión de ⁷Li en las membranas por RMN mediante una secuencia spin eco con un método de gradiente de campos pulsados¹⁵. En este tipo de medidas de resonancia la magnetización del núcleo se lleva a cabo aplicando dos pulsos del campo magnético espaciados por el llamado tiempo de difusión. En ausencia de movimiento la pérdida de coherencia de fase de la señal de RMN provocada por el primer pulso se compensaría con el segundo, pero eso no ocurriría en el caso de que haya difusión molecular durante el tiempo de difusión.

La determinación de los coeficientes de difusión se ha realizado de acuerdo a los parámetros descritos en la sección experimental. En la Figura 33 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros obtenidos para dos polielectrolitos formados por el sistema MBu-VP entrecruzados con MV y con 5 y 10% de V_s respectivamente.

A partir de los espectros se ha calculado el coeficiente de difusión (D) de las distintas redes de acuerdo con Stejskal and Tanner⁴³.

$$A(g) = A(0) \exp[-bD] \quad (36)$$

$$b = (\gamma g t_g)^2 \left(\frac{t_D - t_g}{3} \right)$$

Donde A es la amplitud de eco en presencia de un gradiente de pulso con amplitud g y 0 respectivamente. γ es el radio giromagnético del núcleo observado, t_D el tiempo de difusión, D el coeficiente de difusión y t_g el tiempo de duración del pulso.

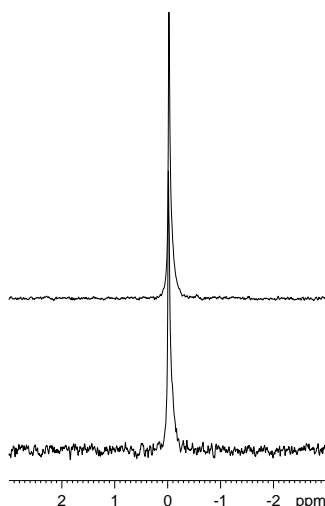


Figura 33: Espectros ${}^7\text{Li}$ MAS NMR correspondientes a las muestras entrecruzadas al 1% con MV y con una carga del 10% V_s (arriba) y 5 % V_s (abajo). La velocidad de giro fue 3 KHz y, para cada muestra se adquirieron cuatro barridos. La diferencia entre la señal y el ruido es debida a la diferencia en concentración de Li^+ y peso de las muestras. Los picos están centrados a -0.02 ppm respecto a LiCl 1M.

La Figura 34 muestra la atenuación de la intensidad de la señal normalizada para los mismos sistemas de la Figura 33. En ambos casos la función monoexponencial (ecuación 36) proporciona un buen ajuste de los datos obtenidos.

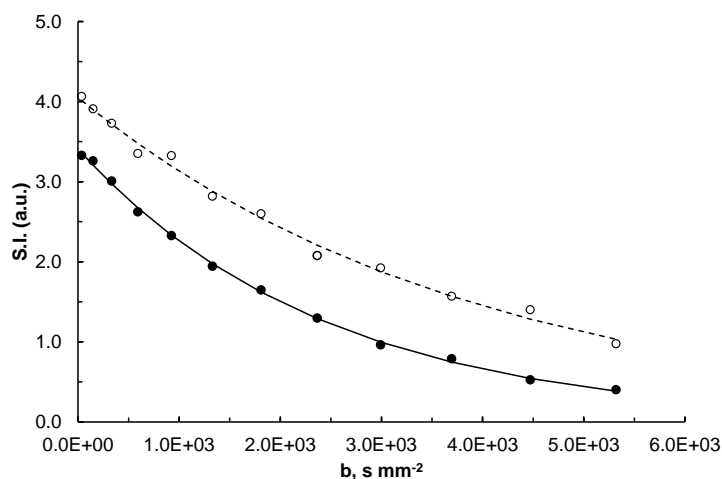


Figura 34: Gráficas de atenuación de eco, donde SI representa la amplitud, correspondientes a las muestras entrecruzadas al 1% con MV y con una carga del 10% V_s (círculos sólidos) y 5 % V_s (círculos huecos). Las líneas continua y discontinua corresponden a la Eq. 1. ${}^7\text{Li}$ $T_1 \leq 5$ s (en todas las muestras). Anchura de línea estática (T_2^*) < 290 Hz




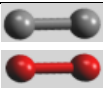

En las dos tablas siguientes se muestran los resultados obtenidos para las polielectrolitos (Tabla 10) y a efectos comparativos los correspondientes a disoluciones de cloruro de litio en agua⁴⁴⁻⁴⁵ (Tabla 11). En las disoluciones de cloruro de litio se dispone de medidas de conductividad en un amplio intervalo de

Capítulo 6

concentraciones, pero sólo de medidas de coeficientes de difusión a concentraciones elevadas. No obstante, los resultados indican que por debajo de una concentración de aproximadamente 200 moles/m³ el sistema se comporta de forma ideal y, por tanto los coeficientes de difusión pueden ser determinados directamente de la ecuación de Einstein al disponer de los valores de las otras magnitudes. Estos valores se han incluido en la Tabla 11 en color azul, para distinguirlos de los propiamente experimentales.

En las disoluciones de cloruro de litio, la ecuación de Einstein (ecuación 35) es 100% válida hasta la concentración indicada de 200 moles/m³, y su aplicación a más altas concentraciones indica que la concentración de moléculas que intervienen en el transporte iónico es inferior al valor nominal inicial, debido a las interacciones iónicas que originan la formación de pares iónicos que no contribuyen a la conducción. Además la conductividad eléctrica disminuye también como consecuencia del descenso de movilidad iónica (<D) conjunto de los iones presentes en forma de iones libres y de pares iónicos.

Tabla 10: Coeficientes de difusión, conductividades y fracción de moléculas transportadoras de carga para los polielectrolitos a 25°C.

Entrecruzante	%Vs	⁷ Li $D^a \times 10^{-10}$ (m ² s ⁻¹)	$10^5 \sigma$ (S/cm) T ^a =25°C	$10^5 \sigma$ (S/cm) Calc. Eq. Einstein T ^a =25°C	Fracción de moléculas transportadoras de carga
1%					
 MM	2	0.60 (0.020)	11	12.3	0.89
	5	1.07 (0.030)	36	66.4	0.54
 VV	2	1.73 (0.070)	15	32.5	0.46
	5	1.98 (0.080)	27	73.1	0.37
 MV	2	1.40 (0.100)	15	28.1	0.53
	5	2.57 (0.080)	49	101.4	0.48
	10	4.11 (0.060)	131	214.5	0.61
 MM+VV	2	1.00 (0.070)	12	20.7	0.58
	5	1.48 (0.060)	41	70.2	0.58
6%					
 MV	2	0.14 (0.008)	3	3.8	0.80

Desviación estándar entre paréntesis

En lo referente al comportamiento de los polielectrolitos, es de reseñar que las conductividades son menores que las que cabría esperar con arreglo a sus concentraciones iónicas y de acuerdo con la citada ecuación de Einstein. Sin embargo, la fracción de moléculas que participan en el transporte iónico es en general superior al 50% y superando en dos casos el 80%. No obstante, la aleatoriedad del comportamiento de los mismos nos inclina a pensar que las causas son debidas de una parte a la incertidumbre en la concentración de centros iónicos, que hemos considerado igual a la del monómero iónico de partida, y de otra a la heterogeneidad de composición del hidrogel con dominios hidrófobos que aún conteniendo un cierto número de unidades iónicas no contribuyan a la conductividad.

Tabla 11: Coeficientes de difusión, conductividades y fracción de moléculas transportadoras de carga para disoluciones acuosas de cloruro de litio a 25°C.

Concentración (moles/m ³)	⁷ Li $D^a \times 10^{10}$ (m ² s ⁻¹)	10 ⁵ σ (S/cm), Exp.	10 ⁵ σ (S/cm), Calc. Eq. Einstein	Fracción de moléculas transportadoras de carga
3120	7.66	15000	17872	0.84
1560	8.68	9190	10126	0.91
780	9.34	5040	5448	0.93
620	9.32			
390	9.75	2740	2844	0.96
195	9.86	1540	1438	≈ 1
100	12.8	958		≈ 1
50	13.4	500.5		≈ 1
20	13.9	209.3		≈ 1
10	14.4	107.4		≈ 1
0.5	15.1	5.7		≈ 1
5	14.6	54.7		≈ 1
1	15.0	11.2		≈ 1

4-Conclusiones:

Se han obtenido redes anfifílicas de VP y metacrilatos alifáticos con buenas propiedades mecánicas y capacidad de hinchamiento en agua.

Dada la alta heterogeneidad composicional de la reacción y la formación de dos especies principales ricas en cada uno de los dos componentes, se ha demostrado que la homología de los grupos polimerizables del entrecruzante tiene una gran influencia en la formación de la red y en sus propiedades principalmente en hinchado. Entrecruzantes homólogos a uno de los componentes como MM o VV hacen que se unan preferentemente cadenas homólogas a él y que un número considerable de cadenas heterólogas queden como fase sol. El entrecruzante asimétrico MV (bihomólogo a ambos monómeros) y la mezcla de homólogos MM+VV entrecruzan de manera más eficiente los dos tipos de cadenas consiguiendo redes anfifílicas de mejor calidad en las que apenas existe fase sol.

Se han podido preparar membranas conductoras en agua mediante la incorporación de V_S como tercer comonómero.

5-Bibliografía:

- 1 Lee, S. M., Kim, B. G., Ha, C. S., Chung, I. & Xie, D. Syntheses and Evaluations of Antitumor and Antiangiogenic Compounds Conjugated with 5-Fluorouracil and Ascorbic Acid. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **23**, 473-489 (2008).
- 2 Fan, F., Schimming, A., Jaeger, D. & Podar, K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *Journal of oncology* **2012** (2011).
- 3 Yeh, H. Y. & Lin, J. C. Surface Phosphorylation for Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Its Sulfonated Derivative: Surface Analysis, Blood Compatibility and Adipose Derived Stem Cell Contact Properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **23**, 233-250 (2012).
- 4 da Costa, D. S., Pires, R. A., Frias, A. M., Reis, R. L. & Pashkuleva, I. Sulfonic groups induce formation of filopodia in mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Chemistry* **22**, 7172-7178 (2012).
- 5 Ferris, C. J. Conducting bio-materials based on gellan gum hydrogels. *Soft Matter* **5**, 3430-3437 (2009).
- 6 Green, R. A. *et al.* Conductive Hydrogels: Mechanically Robust Hybrids for Use as Biomaterials. *Macromolecular bioscience* (2012).
- 7 Kemal, E., Adesanya, K. & Deb, S. Phosphate based 2-hydroxyethyl methacrylate hydrogels for biomedical applications. *J. Mater. Chem.* **21**, 2237-2245 (2010).
- 8 Demirgöz, D., Navarro, R., Pérez, M., Reinecke, H. & Gallardo, A. Asymmetric bihomologous crosslinkers for bicomponent gels—The way to strongly increased elastic moduli. *Journal of Applied Polymer Science* **115**, 896-900 (2009).
- 9 Reinecke, H. & Gallardo, A. Symmetric Versus Asymmetric “Homologous” Vinylic Cross-Linkers in Two-Components Networks: Formation of Pseudo-Conetworks or Pseudo-IPNs. *Macromolecular Theory and Simulations* **18**, 25-29 (2009).
- 10 Tobis, J., Thomann, Y. & Tiller, J. C. Synthesis and characterization of chiral and thermo responsive amphiphilic conetworks. *Polymer* **51**, 35-45 (2010).
- 11 Tobis, J., Boch, L., Thomann, Y. & Tiller, J. C. Amphiphilic polymer conetworks as chiral separation membranes. *Journal of membrane science* **372**, 219-227 (2011).
- 12 Zhang, N. *et al.* Preparation, properties, and drug release of thermo-and pH-sensitive poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate)/poly (N, N-diethylacrylamide) semi-IPN hydrogels. *Journal of materials science* **46**, 1523-1534 (2011).
- 13 Tang, Q., Yu, J. R., Chen, L., Zhu, J. & Hu, Z. M. Poly (dimethyl siloxane)/poly (2-hydroxyethyl methacrylate) interpenetrating polymer network beads as potential capsules for biomedical use. *Current Applied Physics* **11**, 945-950 (2011).

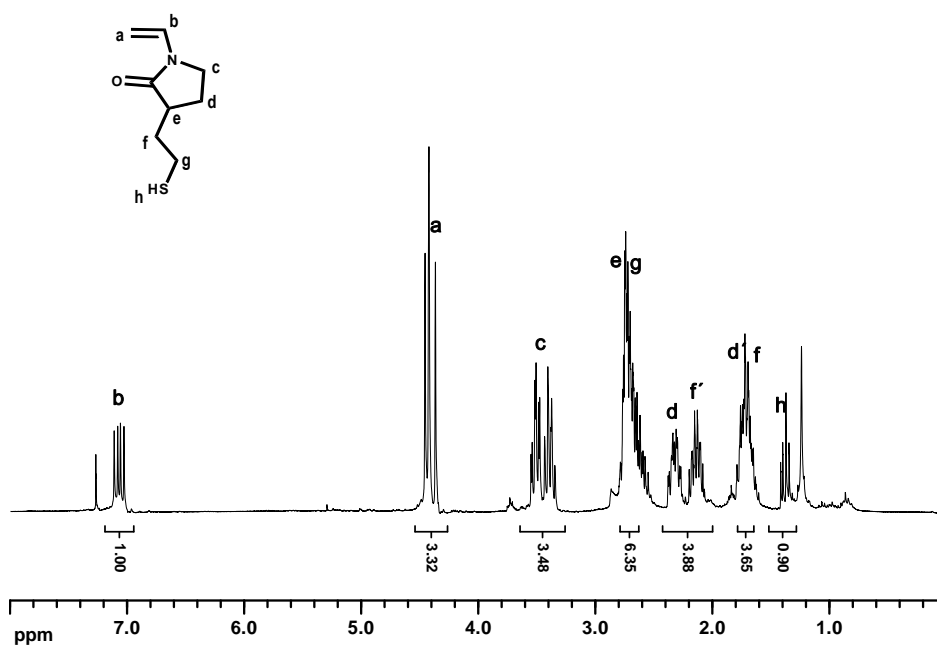
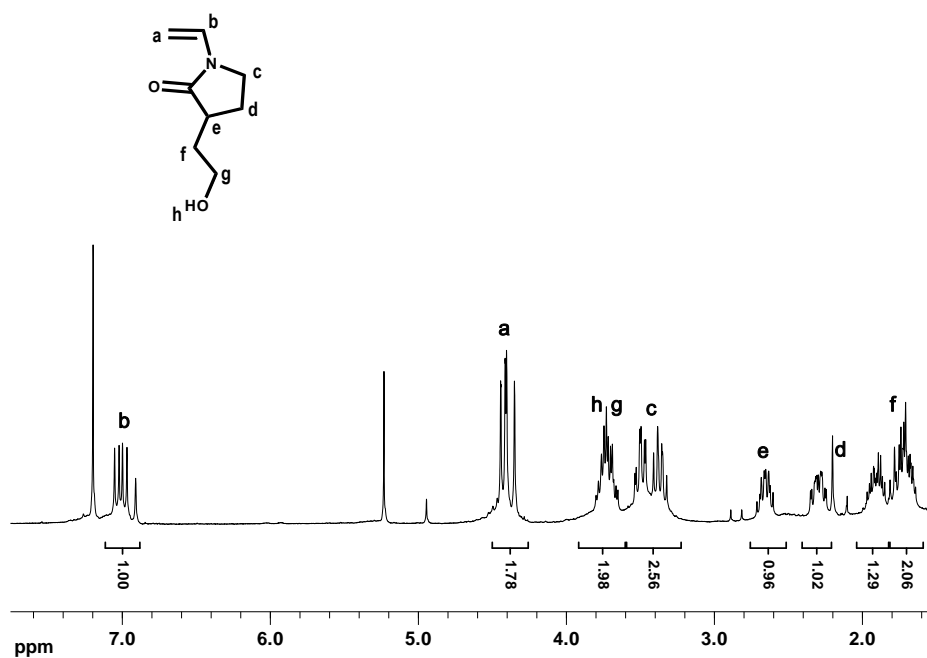
Capítulo 6

- 14 Ratna, D. & Karger-Kocsis, J. Shape memory polymer system of semi-interpenetrating network structure composed of crosslinked poly (methyl methacrylate) and poly (ethylene oxide). *Polymer* **52**, 1063-1070 (2011).
- 15 Stejskal, E. Use of Spin Echoes in a Pulsed Magnetic-Field Gradient to Study Anisotropic, Restricted Diffusion and Flow. *The Journal of Chemical Physics* **42**, 288 (1965).
- 16 Garrido, L., López-González, M., Saiz, E. & Riande, E. Molecular basis of carbon dioxide transport in polycarbonate membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 4253-4260 (2008).
- 17 Reddy, B., Arshady, R. & George, M. Copolymerization of *N*-vinyl-2-pyrrolidone with 2, 4, 5-trichlorophenyl acrylate and with 2-hydroxyethyl methacrylate: Reactivity ratios and molecular weights. *European Polymer Journal* **21**, 511-515 (1985).
- 18 Copol®, R. N., May 2004. Part of the program can be found at: Gallardo, A.; Aguilar, M.R.; Abraham, G.; San Román, J. J. Chem. Edu., . 1210-1215 (2004).
- 19 Handbook, P. D. Oxford University Press, Inc. 963 (1999).
- 20 Nielsen, B. V. *et al.* Poly (alkyl methacrylate) tooth coatings for dental care: evaluation of the demineralisation-protection benefit using a time-resolved in vitro method. *Polymers* **3**, 314-329 (2011).
- 21 Fulcher, G. Analysis of recent measurements of the viscosity of glasses.—ii1. *Journal of the American Ceramic Society* **8**, 789-794 (1925).
- 22 Vogel, H. The law of the relation between the viscosity of liquids and the temperature. *Phys. Z* **22**, 645-646 (1921).
- 23 Tammann, G. & Hesse, W. The dependence of viscosity upon the temperature of supercooled liquids. *Z. Anorg. Allg. Chem* **156**, 245-257 (1926).
- 24 McCrum, N. G., Read, B. E. & Williams, G. *Anelastic and dielectric effects in polymeric solids*. (John Wiley & Sons Ltd, 1967).
- 25 Hodge, I., Ngai, K. & Moynihan, C. Comments on the electric modulus function. *Journal of non-crystalline solids* **351**, 104-115 (2005).
- 26 Sangoro, J. *et al.* Charge transport and mass transport in imidazolium-based ionic liquids. *Physical Review E* **77**, 051202 (2008).
- 27 Sangoro, J. *et al.* Electrical conductivity and translational diffusion in the 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid. *The Journal of Chemical Physics* **128**, 214509 (2008).
- 28 Iacob, C. *et al.* Charge transport and glassy dynamics in imidazole-based liquids. *The Journal of Chemical Physics* **129**, 234511 (2008).
- 29 Jonscher, A. K. *Universal relaxation law: a sequel to Dielectric relaxation in solids*. (Chelsea Dielectrics Press, 1996).
- 30 Jonscher, A. Physical basis of dielectric loss. (1975).
- 31 Jonscher, A. K. Dielectric relaxation in solids. *Journal of Physics D: Applied Physics* **32**, R57 (1999).

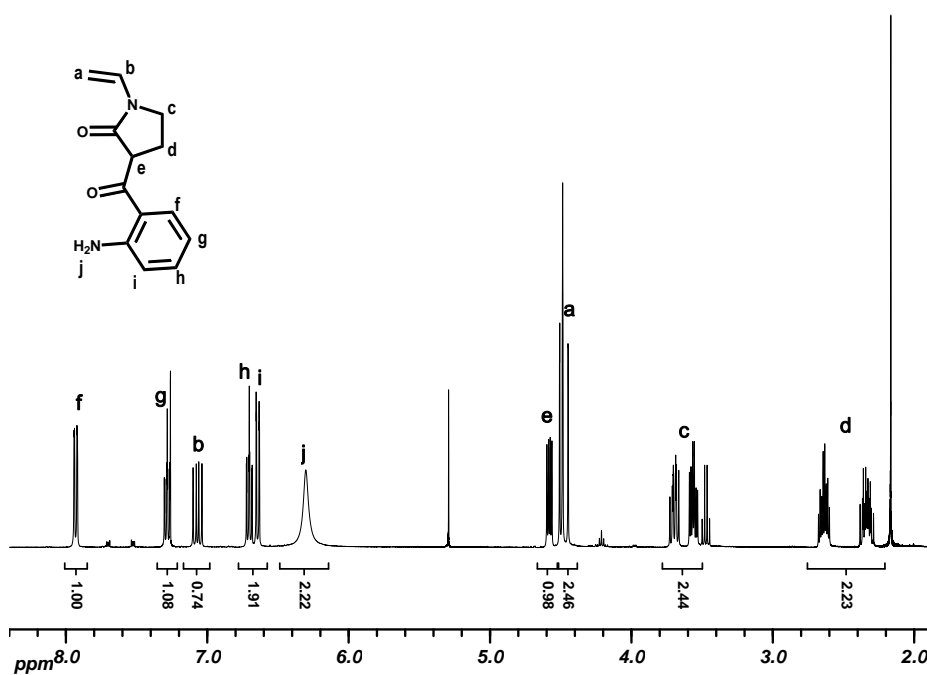
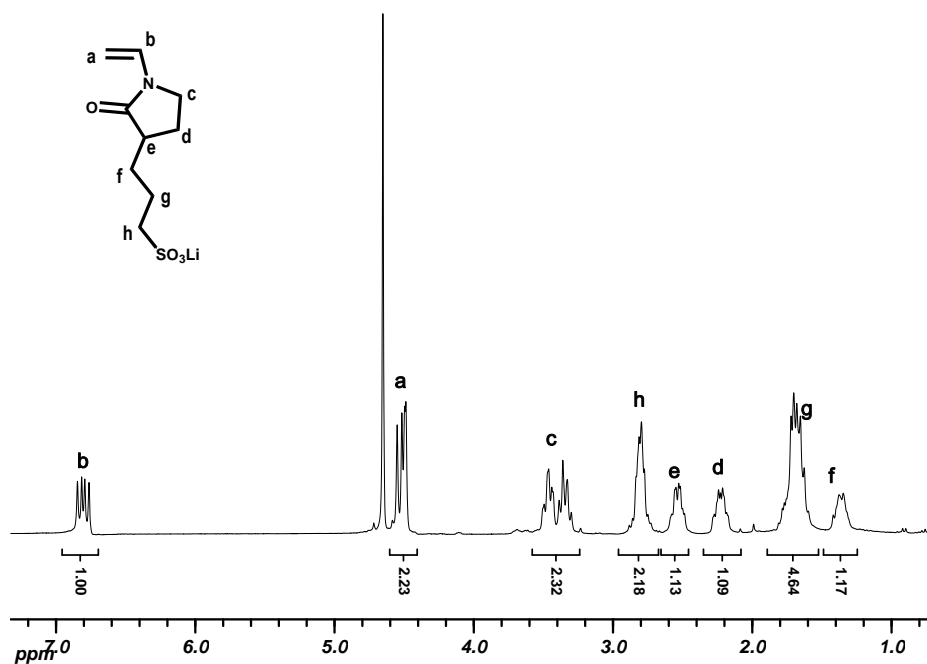
- 32 Dyre, J. C., Maass, P., Roling, B. & Sidebottom, D. L. Fundamental questions relating to ion conduction in disordered solids. *Reports on Progress in Physics* **72**, 046501 (2009).
- 33 Wojnarowska, Z. *et al.* Fundamentals of ionic conductivity relaxation gained from study of procaine hydrochloride and procainamide hydrochloride at ambient and elevated pressure. *The Journal of Chemical Physics* **136**, 164507 (2012).
- 34 Barton, J. L. La Relaxation Diélectrique de Quelques Verres Ternaries Silice Oxyde Alcalin Oxyde Alcalino-Terreux. *Verres et Refr.* **20**, 324–328 (1966).
- 35 Namikawa, H. Characterization of the diffusion process in oxide glasses based on the correlation between electric conduction and dielectric relaxation. *Journal of non-crystalline solids* **18**, 173-195 (1975).
- 36 Nakajima, T. 1971 Annual Report, Conference on Electric Insulation and Dielectric Phenomena. (1972).
- 37 Dyre, J. C. On the mechanism of glass ionic conductivity. *Journal of non-crystalline solids* **88**, 271-280 (1986).
- 38 Coelho, R. *Physics of Dielectrics for the Engineer*. Vol. 6 (Elsevier New York, 1979).
- 39 Schütt, H. & Gerdes, E. Space-charge relaxation in ionically conducting oxide glasses. I. Model and frequency response. *Journal of non-crystalline solids* **144**, 1-13 (1992).
- 40 Schütt, H. & Gerdes, E. Space-charge relaxation in ionically conducting glasses. II. Free carrier concentration and mobility. *Journal of non-crystalline solids* **144**, 14-20 (1992).
- 41 Jönsson, M., Welch, K., Hamp, S. & Strömme, M. Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station. *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 10165-10169 (2006).
- 42 Bandara, T. & Mellander, B. Evaluation of Mobility, Diffusion Coefficient and Density of Charge Carriers in Ionic Liquids and Novel Electrolytes Based on a New Model for Dielectric Response. (2011).
- 43 Stejskal, E. O. & Tanner, J. Spin diffusion measurements: Spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics* **42**, 288 (1965).
- 44 Garrido, L. *et al.* Influence of the Water Content on the Diffusion Coefficients of Li⁺ and Water across Naphthalenic Based Copolyimide Cation-Exchange Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* (2012).
- 45 Physics, H. o. C. a. (ed Forty-Sixt Edition) (The Chemical Rubber Co, 1964).

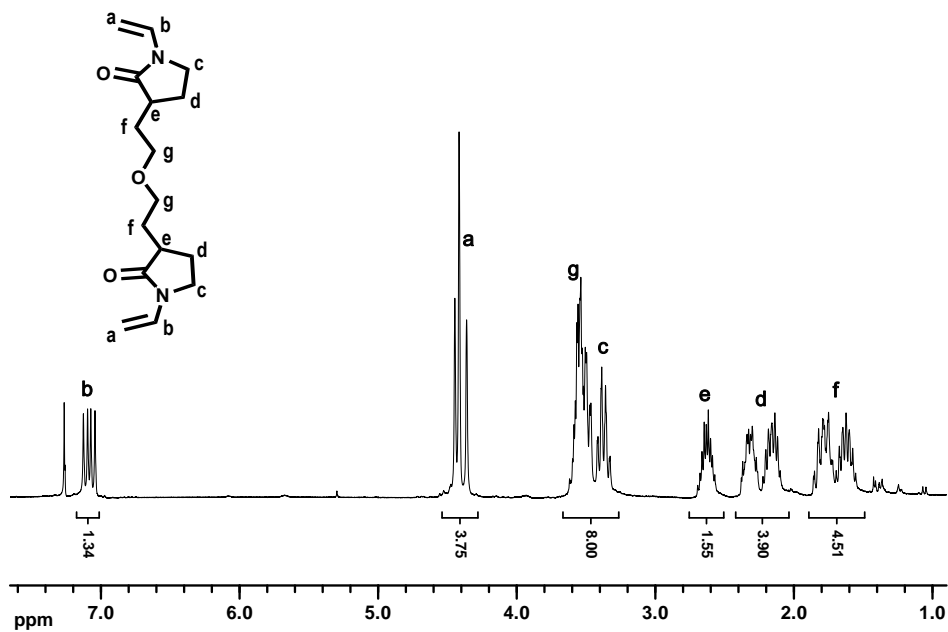
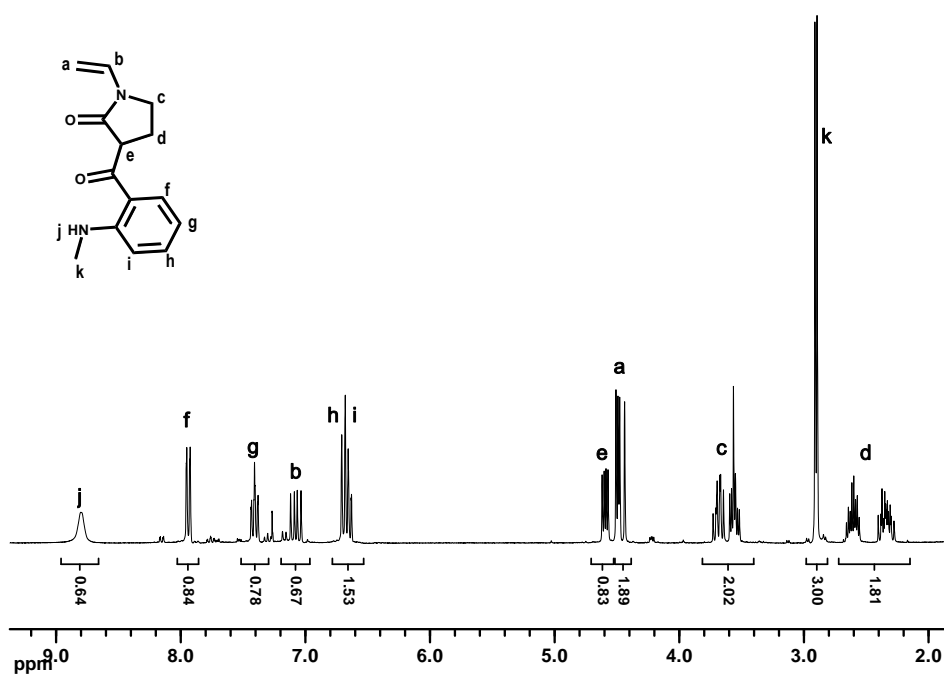
Apéndices

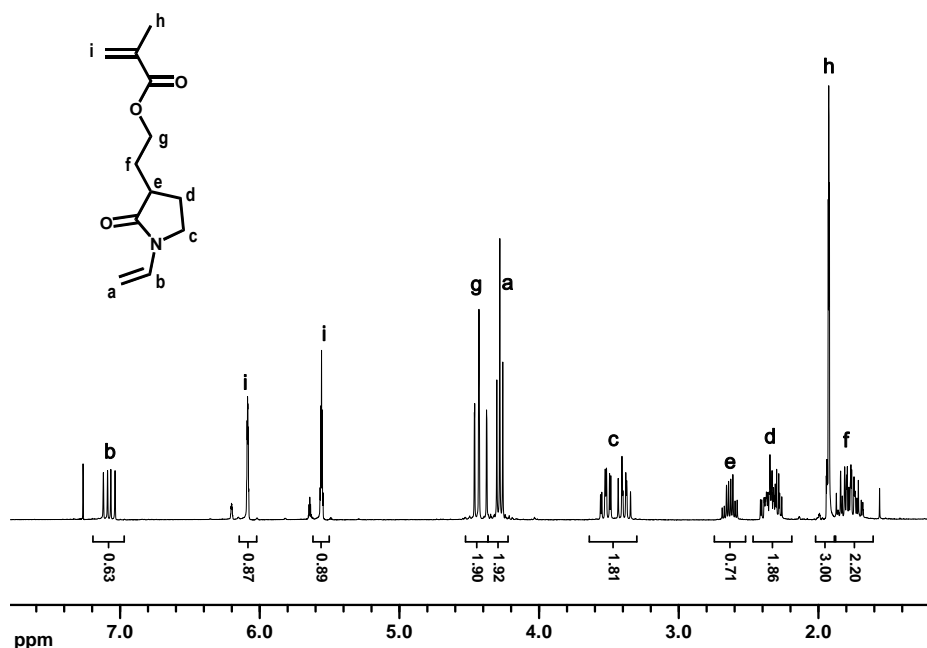
Apéndice 1 (Capítulo 1):



Apéndices







Apéndice 2 (Capítulo 6):

Ejemplo de cálculo de los datos de la Tabla 1 (capítulo 6), para MBu-VP:

En este caso $F_{M0}=0.4$, es decir, hay un 40% molar de MBu y un 60% de VP a tiempo 0. De cada 100 unidades iniciales, 40 son de MBu y 60 VP. El programa Copol indica que la conversión límite en que $f_M=0.4$ ($f_M=F_{M0}$, aquella que divide las cadenas de tipo C_M y C_V) es de 0.56. COPOL dice que C_M , que es el acumulado de polímero a esta conversión, tiene una composición promedio $f_{MBucumCM}$ de 0.66. Por tanto, de cada 100 monómeros se han consumido 56, y de estos 56 el 66% son MBu y el resto VP (37 y 19 respectivamente). Es decir, de cada 100 unidades iniciales (40 MBu y 60 VP), 37 MBu y 19 VP se han incorporado a C_M mientras que el resto, 3 MBu y 41 VP, lo han hecho a C_V para un 100% de conversión. Este balance de materia se puede plasmar en forma de ecuaciones para proporcionar los parámetros de reparto (siempre para un 100% de conversión):

$$MBu_{CM} = \frac{(\text{conversión límite}) f_{MBucum}}{F_{M0}} = \frac{0.56 * 0.66}{0.40} = \frac{0.37}{0.40}$$

$$VP_{CM} = \frac{(\text{conversión límite}) (1 - f_{MBucum})}{1 - F_{M0}} = \frac{0.56 * 0.34}{0.60} = \frac{0.19}{0.60}$$

$$MBu_{CV} = \frac{F_{M0} - (\text{conversión límite}) f_{MBucum}}{F_{M0}} = \frac{0.03}{0.40}$$

$$VP_{CM} = \frac{(1 - F_{M0}) - (\text{conversión límite}) (1 - f_{MBucum})}{1 - F_{M0}} = \frac{0.41}{0.60}$$

En el caso del sistema MDo-VP el cálculo es similar aunque $F_{M0}=0.4$, la conversión límite es de 0.47 y $f_{MDocumCM}=0.54$.

Aproximando la densidad de la unidad monomérica a la del monómero, se obtiene fácilmente la relación de volúmenes entre C_M y C_V . En el caso MBu-VP tomado como ejemplo, $\rho_{VP} = 1.04$ g/cc, $\rho_{MBu} = 0.895$ g/cc y las masas molares de MBu y VP son 142.2 y 111.1 g/mol. Por tanto





$$\text{relación volumen } \frac{C_M}{C_V} = \frac{\frac{142.2}{0.895} 37 + \frac{111.1}{1.04} 19}{\frac{142.2}{0.895} 3 + \frac{111.1}{1.04} 41} = 1.63$$

Para el sistema MDo-VP, $\rho_{MDo} = 0.87$ g/cc y la masa molar de MDo es 254.4 g/mol.

Apéndice 3 (Capítulo 6):

Podemos definir primero FE_M y FE_{VP} , las fracciones de funcionalidades M ó VP que forman parte del entrecruzante. Por ejemplo, una FE_M de 0.05 significa que 5 de cada 100 metacrilatos en la reacción pertenecen a un entrecruzante. Estos valores vienen dados por:

$FE_M = \frac{f_E n_M}{F_{M0}}$ y $FE_V = \frac{f_E n_V}{(1 - F_{M0})}$, siendo f_E la fracción molar de entrecruzante frente al total de monómeros (0.01 para el 1% analizado aquí) y n_M y n_V el número de funcionalidades M o VP por entrecruzante. $n_M = 2$ para MM, 1 para MV, 1 para MM+VV, 0 para VV. $n_V = 2$ para VV, 1 para MV, 1 para MM+VV, 0 para MM.

		MBu-VP $F_{M0}=0.4$	MDo-VP $F_{M0}=0.27$
MM 	FE_M	0.05	0.074
	FE_{VP}	0	0
VV 	FE_M	0	0
	FE_{VP}	0.033	0.027
MV 	FE_M	0.025	0.037
	FE_{VP}	0.017	0.014
MM+VV 	FE_M	0.025	0.037
	FE_{VP}	0.017	0.014

Con este dato podemos calcular el número de unidades promedio entre nudos (que podemos llamar \bar{X}), que viene dado, para cada especie C_M ó C_V , por la relación entre unidades totales y unidades pertenecientes a un entrecruzante:

Apéndices

$$\overline{X}_{CM} = \frac{1}{f_{McumCM} FE_M + (1 - f_{McumCM}) FE_V}$$

$$\overline{X}_{CV} = \frac{1}{f_{VcumCV} FE_V + (1 - f_{VcumCV}) FE_M}$$

Podemos también predecir la homología de los entrecruzamientos, es decir, si éstos forman uniones C_M-C_M , C_M-C_V (ó C_V-C_M) ó C_V-C_V (C_i-C_j de forma genérica donde $i,j=M$ ó VP). Para un determinado entrecruzante difuncional E_1-E_2 , donde E_k puede ser cualquiera de las dos funcionalidades M ó VP , la probabilidad de que cualquiera de las dos funcionalidades del entrecruzante se incorpore a una C_i genérica ($p_{E_k-C_i}$) viene dada por los datos de reparto indicados en la Tabla 1 del capítulo 6, M_{CM} , M_{CV} , V_{CM} y V_{CV} (U_{k-C_i} de forma genérica):

$$p_{E_k - C_i} = f_{E_1 - E_2} U_{k - C_i}$$

siendo $f_{E_1-E_2}$ la fracción de este tipo de entrecruzante en el total de entrecruzantes (en el caso de un solo tipo $f=1$, pero cuando hay mezcla equimolar de MM y VV , $f=0.5$).

Por tanto, la probabilidad de que un entrecruzante genérico E_1-E_2 una cadenas C_i-C_j viene dado por:

$$p_{C_i - C_j} = (f_{E_1 - E_2} U_{1 - C_i}) (f_{E_1 - E_2} U_{2 - C_j})$$

Ejemplo: MBu-VP entrecruzado con MM al 1% molar, U_k es M , $f_{E_1-E_2}=1$ ya que solo hay un tipo de entrecruzante, y la probabilidad de que cada una de las dos funcionalidades M se incorpore a C_M ó a C_V viene dada por los valores respectivos de reparto de la Tabla 1, $M_{CM}=37/40$ y $M_{CV}=3/40$. Por tanto, las probabilidades de las diferentes uniones son:






$$p_{CM - CM} = \left(\frac{37}{40}\right) \left(\frac{37}{40}\right) = 0.856$$

$$p_{CM - CV^*} = 2 \left(\frac{37}{40}\right) \left(\frac{3}{40}\right) = 0.139$$

$$p_{CV - CV} = \left(\frac{3}{40}\right) \left(\frac{3}{40}\right) = 0.006$$

Lógicamente, en este caso la mayoría de las uniones son entre cadenas ricas en M . El asterisco hace referencia $p_{CM-CV^*} = p_{CM-CV} + p_{CV-CM}$ y hay que incluir un 2 en la fórmula. Los resultados de estos cálculos están recogidos en la Tabla 2 (capítulo 6).

Apéndice 4 (Capítulo 6):

MBu-VP+ Vs										
Entrecruzante	%Vs	MBu mol	VP mol	Vs mol	VMBu g/cm ³	VVP _{total} g/cm ³	V _{H2O} g/cm ³	V _{total} g/cm ³	molLi/m ³	gLi/m ³
6%										
 MV	2	40	55,86	1,14	5394,11	5394,10	5104,23	0,02	71,73	502,13
1%										
 MM	2	39	44,1	0,9	5259,26	4258,50	6921,33	0,02	54,75	383,23
	5	39	44,65	2,35	5259,26	4598,17	4311,76	0,01	165,85	1160,97
 VV	2	40	53,9	1,1	5394,11	5204,83	11329,51	0,02	50,16	351,14
	5	40	52,25	2,75	5394,11	5380,83	17113,17	0,03	98,61	690,26
 MV	2	40	55,86	1,14	5394,11	5394,10	10451,51	0,02	53,67	375,71
	5	40	52,25	2,75	5394,11	5380,83	15292,62	0,03	105,50	738,47
	10	40	51,3	5,7	5394,11	5880,50	29548,91	0,04	139,63	977,38
 MM+VV	2	40	53,9	1,1	5394,11	5204,83	9302,12	0,02	55,27	386,91
	5	40	54,15	2,85	5394,11	5576,50	11505,77	0,02	126,80	887,60

- Los moles de cada componente se calculan a partir de las composiciones de C_v y C_m descritas anteriormente.
- Para calcular el volumen de los componentes MBu y VP se considera: P_{mMBu} = 142 g/mol, P_{mVP} = 111g/mol, P_{mVs} = 239g/mol, ρ_{PMBu} = 1.053g/cm³ y ρ_{PVP} = 1.2g/cm³.
- VVP_{total}, representa el volumen de las unidades VP + V_s.
- La masa de agua equivale al volumen de agua por considerar ρ_{H2O} = 1g/cm³. La masa de agua se calcula a partir de los datos de hinchamiento vistos anteriormente como:

$$Masa_{H_2O} = \frac{masa_{polimero} \times hinchamiento}{100}$$

Donde la masa de polímero se calcula a partir de los moles de la tabla, para cada componente, por su peso molecular.

- El Volumen total se calcula como suma de los volúmenes: VM_{Bu} + VVP_{total} + V_{H2O}.
- Los moles de V_s equivalen a los moles de Li (P_{mLi} = 7g/mol).

Agradecimientos

Agradecimientos

El trabajo de síntesis del capítulo uno se realizó en colaboración con el Dr. Rodrigo Navarro y la Dra. Mónica Pérez.

Los estudios de citotoxicidad del capítulo tres fueron realizados en el National Center of Biomedical Engineering Science (NCBES) de la National University of Ireland, Galway, bajo la supervisión del Dr. Yury Rochev durante una estancia de la beca FPI subvencionada por el ministerio de ciencia e innovación.

Los ensayos de antiangiogénesis se realizaron en colaboración con los Drs. Luis García, bajo la supervisión de M^a Rosa Aguilar y Julio San Román del grupo de Biomateriales del ICTP.

Los ensayos de interacción del capítulo cuatro se realizaron en colaboración con Juan Pablo Pino en el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Austral de Chile (UaCh) en Valdivia bajo la supervisión del Dr. Ignacio Moreno Villoslada durante una estancia de la beca FPI subvencionada por el ministerio de ciencia e innovación.

El trabajo del capítulo cinco se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Inmaculada Aranaz. Las nanopartículas magnéticas empleadas en este capítulo fueron preparadas por el grupo del Prof. Erhan Piskin, Hacettepe University, Ankara, Turquía.

Los estudios de conductividad del capítulo seis se realizaron bajo la supervisión del Dr. Julio Guzmán del departamento de química física del ICTP y los de resonancia de sólidos con la colaboración del Dr. Leoncio Garrido del mismo departamento. La interpretación de los resultados de DMTA se realizó con la colaboración del Dr. Daniel López.

Se agradece la inestimable ayuda del servicio de caracterización del ICTP dirigido por la Dra. Carolina García, particularmente a Mónica Pérez la caracterización de las partículas por SEM, a Lautaro Biancotto por los ensayos de DMTA, y a la propia Carolina García por las medidas de DETA.